



诱导神经干细胞的研究进展及应用前景

唐玺和, 陈志国, 张 愚

(首都医科大学宣武医院细胞治疗中心, 北京 100053)

【摘要】 诱导神经干细胞(induced neural stem cells, iNSCs)是通过在成体细胞内转入特定外源因子而获得。目前主要有两种途径获得 iNSCs,即直接诱导法和间接诱导法(需经历重编程过程中不稳定的中间状态)。与诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)比较, iNSCs 直接将成体细胞重编程为神经干细胞,而不经 iPSCs 再分化为神经干细胞,可减少其致瘤性,缩短诱导周期,提高转分化效率,这将使其更适于临床应用。本文就 iNSCs 的研究进展,应用前景加以综述。

【关键词】 诱导神经干细胞;体细胞重编程;诱导多能干细胞;治疗

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0067-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 002. 016

Advances and application of induced neural stem cells

TANG Xi-he, CHEN Zhi-guo, ZHANG Yu

(Cell Therapy Center, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】 It has been reported that induced neural stem cells(iNSCs) can be obtained from rodent and human somatic cells through the forced expression of defined factors. Two different approaches have been successfully used to obtain iNSCs; a direct method and an indirect method which involves an unstable intermediate state. Compared with induced pluripotent stem cells (iPSCs) and embryonic stem cells(ESCs), iNSCs are committed towards neural lineage, enabling them with a lower risk of tumorigenicity and more efficient transdifferentiation which makes it suitable for clinical use in the future.

【Key words】 Induced neural stem cells; Somatic cell reprogramming; Induced pluripotent stem cells; Therapy

干细胞为许多神经系统疾病治疗带来希望,比如帕金森氏病^[1],肌萎缩性脊髓侧索硬化症^[2],老年性痴呆^[3]及脊髓外伤性^[4-6]疾病。长期以来,科研人员试图使用外科技术或者立体定向技术将 ESCs(胚胎干细胞)或者由其分化到某一阶段的神经细胞移植到病变部位,使其定植并产生功能,达到治疗作用。大量研究表明,使用胚胎干细胞治疗帕金森病、脊髓损伤及糖尿病有一定作用,但胚胎干细胞的致瘤性,异体移植的免疫排斥以及伦理学

争议限制其应用。2006 年, Yamanaka 利用小鼠成纤维细胞成功获得 iPSCs,开创了干细胞研究的新局面^[7],该研究使自体干细胞移植成为可能。2007 年, Yamanaka^[8]及 Wernig^[9]报道了由人成纤维细胞获得 iPSCs,之后 iPSCs 治疗相关疾病的细胞模型及动物模型也成功建立,为 iPSCs 向临床应用做了大量前期工作。但是,研究发现, iPSCs 用于临床治疗还面临很多问题,如致瘤性,定向分化效率低,安全性问题。因此,将体细胞直接诱导为成体干细胞,

【基金项目】 973 计划重点项目(2012CBA01307) 帕金森氏病干细胞治疗的研究。

【作者简介】 唐玺和(1981-)男,博士研究生,研究方向:诱导神经干细胞治疗帕金森氏病。

【通讯作者】 陈志国(1977-),研究员,博士生导师,研究方向:神经退行性疾病的干细胞治疗。Email: chenzhiguo2999@ yahoo. cn; 张愚(1967-),研究员,博士生导师,研究方向:帕金森氏病的神经干细胞治疗。Email: yaz@ bjsap. org。

而不经*iPSCs*阶段,以减少其致瘤性,提高分化效率成为研究热点。

1 体外获得*iNSCs*的方法

目前诱导神经干细胞方法主要分为直接诱导法和间接诱导法。直接诱导即在成体细胞内转入神经干细胞表达的特定外源基因, *microRNAs* 或者小分子蛋白等, 直接获得*iNSCs*。间接诱导: 在成体细胞重编程为*iPSCs*过程中(可以称之为中间状态或者不稳定状态), 改变诱导环境, 使其成为*iNSCs*。

1.1 成体细胞直接重编程为神经干细胞或者神经前体细胞

该方法主要是在成体细胞中直接转入神经干细胞表达的某些相关基因, 使其直接重编程为神经干细胞。Lujan^[10]等报道转入 11 个神经干细胞相关的外源基因可以将小鼠成纤维细胞诱导成神经干细胞, 该细胞在体外可以分化出星形胶质细胞, 少突胶质细胞及成熟神经元, 并能在体内存活。Sheng C 等^[11]转入 *Ascl1*、*Ngn2*、*Hes5* 等 9 个神经干细胞相关基因将小鼠睾丸支持细胞诱导成神经干细胞, 该细胞在体外能分化出多巴胺能神经元, 胆碱能神经元及神经胶质细胞。Han 等^[12]报转入 *Brn4*、*sox2*、*klf4*、*c-Myc*、*E47* 基因或转入 *Brn4*、*sox2*、*klf4*、*c-Myc* 均将小鼠成纤维细胞诱导为神经干细胞, 诱导神经干细胞能在体外在传代 130 次以上, 且与野生型神经干细胞形态, 基因表达, 十分相似。研究还发现转入 4 因子与 5 因子诱导的神经干细胞与野生型神经干比较, 同样有成熟的分化能力, 可分化出星形胶质细胞、神经元、少突胶质细胞。Ring 等^[13]用逆转录病毒载体携带 *sox2* 转染小鼠成纤维细胞, 6~10 d 后就出现神经干细胞克隆。而转染人成纤维细胞后, 5 d 内就出现了神经干细胞克隆, 将诱导神经干细胞与野生型神经干细胞同时移植免疫缺陷小鼠, 没有肿瘤形成, 证明诱导神经干细胞的安全性。Saiyong Zhu^[14]等只使用 OCT4 单个基因联合 A83-01、CHIR99021、NaB、LPA、rolipram、SP600125 成功的将人成纤维细胞诱导为神经干细胞, 经过 4 周体外自然分化, 能分化出成熟的神经元。移植小鼠脑内后, 该细胞能向神经元分化, 且无肿瘤形成。Kim SM 等利用逆转录病毒携带 *Klf4*、*c-Myc*、*Sox2*、*Brn4* 转染小鼠成纤维细胞, 4 周后获得诱导神经干细胞, 神经干细胞无成瘤性^[15]。

1.2 成体细胞经过*iPSCs*中间状态诱导为神经干

细胞, 即在成体细胞中转入经典 Yamanaka 四因子(或者略加减)后, 在*iPSCs*诱导的早期改变培养基, 使其能向神经干细胞方向发展

Kim 等^[16]使用 Dox 载体系统在小鼠成纤维细胞中转入 *oct4*、*sox2*、*klf4*、*c-myc* 基因, 在含有 LIF 的 MEF 上培养 3~6 d 后继续在神经干细胞培养基中培养 8~9 d, 将会有表达 *plzf*、*pax6* 等神经干细胞标志的克隆出现, 这种“类似神经干”细胞, 可以继续分化出星形胶质细胞、神经元, 但是此种干细胞在体外只能扩增 3~5 代。裴端卿等^[17]使用非整合载体 oriP/EBNA episomal 携带 *oct4*、*sox2*、*sv40lt*、*klf4* 和 *microRNA302-367* 电转人尿液中提取的活细胞, 然后在神经干细胞培养基中加入 CHIR99021、PD0325901、A83-01、Thiazoviv、DMH1, 电转后 12 d 可见神经干细胞克隆出现, 且能表 *sox1*、*sox2*、*pax6* 等神经干细胞标志性基因, 诱导的神经干细胞能分化成星形胶质细胞, 多巴胺能神经元, 谷氨酸能神经元, 但是不能自然分化为少突胶质细胞, 在使用 PDGF-AA、NT3 等小分子刺激后, 可以分化出少突胶质细胞。同时, 将诱导神经干细胞移植入新生小鼠纹状体后, 神经干细胞能够存活, 迁移, 脑内没有形成肿瘤, 证明诱导神经干细胞的体外分化能力及安全性。张素春等^[18]等使用仙台病毒为载体, 将 *oct4*、*sox2*、*klf4*、*c-Myc* 转入人成纤维细胞, 在神经干细胞培养基中加入 LIF、CHIR99021、SB431542 三个小分子, 之后通过升高培养温度(39℃)使得仙台病毒灭活, 第 13 天可见神经干细胞克隆形成。其表达 *nestin*、*sox1*、*sox2*、*fabp7*、*pax6*、*hes5*、*notch1* 等神经干细胞的标志性基因, 并且在体外可以分化为星形细胞, 神经元及少突胶质细胞, 该类细胞还具有脑区特异性。目前经*iPSCs*中间状态诱导神经干细胞的方法受到推崇, 因为其诱导体系随着诱导*iPSCs*体系变革而更加安全。此前诱导*iPSCs*方法的缺点主要是向供体细胞中引入外源基因, 且病毒转染时可能将外源基因整合到细胞基因组中, 导致供体细胞基因突变, 另外, *c-Myc*、*Klf4* 是致癌基因, 可以增加细胞的成瘤性, 因此, 提高*iPSCs*的安全性主要在转入因子选择及载体的进一步改进。Nakagawa M 等^[19]在无 *c-Myc* 下将体细胞重编程为*iPSCs*, 降低了*iPSCs*的成瘤性。Anokye-Danso 等^[20]采用 *miRNAs* 在无转录因子作用下直接诱导*iPSCs*。邓宏魁等^[21]单纯使用化学小分子成功诱导出*iPSCs*, 提供了更加安全的诱导系统。另外, 除了成纤维细

胞做为供体细胞外, Loh Y. HStaerk, JDowey SN 等^[22-24]使用外周血中的 T 细胞或单个核细胞成功诱导出 iPSCs, 免去了获取成纤维细胞的侵袭性操作, 这也提示了使用外周血单核细胞诱导神经干细胞的可能性。

2 诱导神经干细胞的优点及应用前景

2.1 安全性与多能性的统一

神经干细胞移植被认为是治疗很多神经变性疾病及神经退行性疾病的新方法, 除了病变神经细胞的功能替代, 干细胞释放的神经保护因子及生长因子对疾病治疗也有作用。目前开展的动物实验模型有帕金森病^[1, 25], 亨廷顿舞蹈症^[26], 多发性硬化^[27], 脑卒中^[28]及脊髓损伤^[29]等, 实验结果显示干细胞治疗效果明显, 但是其用于临床治疗的效果并不明显, 这可能与移植细胞的数量, 移植方法等有关^[30-33]。ESC 细胞与 iPSCs 具有多向分化能力, 移植后成瘤性强^[34], 而诱导神经干细胞具有分化的特异性, 主要向星形胶质细胞, 少突胶质细胞, 神经元方向分化, 其致瘤性下降^[35]。与成体细胞相比, 神经干细胞在移植后仍然能维持自我更新及多向分化能力, 对于脑神经损伤及脊髓损伤这种并非只是单一神经细胞病变的疾病, 使用诱导神经干细胞治疗更加合适^[36, 37]。

2.2 诱导自体神经干细胞减少移植免疫排斥

同 ESC 细胞及其他供体来源干细胞移植相比, iPSCs 与诱导神经干细胞可来自本体, 能减少免疫排斥反应。但是经过细胞重编程, 外源基因插入以及某些自体基因被修饰, 使得自体 iPSCs 移植仍然存在免疫反应^[38], iPSCs 是否因为某些基因表达不同而较 iPSCs 引起移植后免疫反应减弱, 需要进一步探讨。由供体细胞获得诱导神经干细胞需要一定周期, 这对一些慢性疾病影响较小, 但对于存在治疗时间窗的急性疾病, 如脑卒中, 将影响其临床应用。

2.3 诱导周期缩短及分化效率提高

与 iPSCs 相比较, 诱导神经干细胞周期明显缩短^[10, 12, 13], 尽管诱导神经干细胞效率不高, 但其能在体外快速扩增, 数量能够满足临床需求, 而且更易分化为神经细胞。而由 iPSCs 分化神经干细胞, 需要经历不同的分化阶段, 耗时, 且所得细胞并非处同一分化阶段, 单一细胞纯度不高^[34], 这是 iPSCs 临床应用前要解决的问题。

目前, 诱导神经干细胞研究主要集中在如何缩短体细胞转分化的周期及提高转分化效率, 以及外源因子载体的安全性, 移植治疗的有效性。另外, 病变部位细胞原位转分化为神经干细胞以起到治疗作用也是很有意义的研究方向。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Moghadam FH, Alaie H, Karbalaie K, et al. Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats [J]. Differentiation, 2009, 78(2-3): 59-68.
- [4] Corti S, Nizzardo M, Nardini M, et al. Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy [J]. J Clin Invest, 2008, 118(10): 3316-3330.
- [5] Lunn JS, Sakowski SA, Federici T, et al. Stem cell technology for the study and treatment of motor neuron diseases [J]. Regen Med, 2011, 6(2): 201-213.
- [6] Nandoe Tewarie RS, Hurtado A, Bartels RH, et al. Stem cell-based therapies for spinal cord injury [J]. J Spinal Cord Med, 2009, 32(2): 105-114.
- [7] 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.
- [8] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131(5): 861-872.
- [9] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state [J]. Nature, 2007, 448(7151): 318-324.
- [10] 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.
- [11] Sheng C, Zheng Q, Wu J, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors [J]. Cell Res, 2012, 22(1): 208-218.
- [12] 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.
- [13] Ring KL, Dong LM, Balestra RJ, et al. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor [J]. Cell Stem Cell, 2012, 11(1): 100

- 109.
- [14] Zhu S, Ambasadham R, Sun W, et al. Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 126 - 129.
 - [15] Kim SM, Flaßkamp H, Hermann A, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts into induced neural stem cells [J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(4): 871 - 881.
 - [16] 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.
 - [17] Wang L, Wang LL, Huang WH, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(1): 84 - 89.
 - [18] Lu J, Liu H, Huang CT, et al. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts [J]. *Cell Rep*, 2013, 3(5): 1580 - 1589.
 - [19] Nakagawa M, Kojanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 10110 - 10116.
 - [20] 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.
 - [21] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds [J]. *Science*, 2013, 341(6146): 651 - 654.
 - [22] Loh YH, Hartung O, Li H, et al. Reprogramming of T cells from human peripheral blood [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 15 - 19.
 - [23] Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, et al. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 20 - 24.
 - [24] Dowey SN, Huang X, Chou BK, et al. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(11): 2013 - 2021.
 - [25] Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2002, 418(6893): 50 - 56.
 - [26] Dunnett SB, Rosser AE. Stem cell transplantation for Huntington's disease [J]. *Exp Neurol*, 2007, 203(2): 279 - 292.
 - [27] Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis [J]. *Nature*, 2003, 422(6933): 688 - 694.
 - [28] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(3): 330 - 338.
 - [29] Schira J, Gasis M, Estrada V, et al. Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood [J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 2): 431 - 446.
 - [30] Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(10): 710 - 719.
 - [31] Cicchetti F, Saporta S, Hauser RA, et al. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(30): 12483 - 12488.
 - [32] Yamout B, Hourani R, Salti H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study [J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 227(1 - 2): 185 - 189.
 - [33] Lee JS, Hong JM, Moon GJ, et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(6): 1099 - 1106.
 - [34] 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.
 - [35] Yamanaka S. A fresh look at iPS cells [J]. *Cell*, 2009, 137(1): 13 - 17.
 - [36] 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.
 - [37] 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.
 - [38] Zhao TB, Zhang ZN, Rong ZL, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2011, 474(7350): 212 - 215.

〔修回日期〕2014-11-05