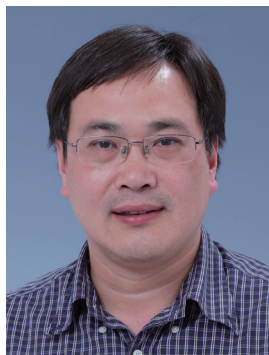


DOI: 10.13376/j.cblls/2016118

文章编号: 1004-0374(2016)08-0883-05



焦建伟, 中国科学院动物研究所研究员, 博士生导师, 2011年入选中国科学院“百人计划”, 中国科学院干细胞与再生医学先导专项总体组成员, 科技部“973”和重点专项评审专家。主要研究方向是神经干细胞机制研究。研究组近年来的主要研究工作包括: (1) 揭示染色体重塑基因影响神经干细胞自我更新; (2) 发现组蛋白甲基酶调控神经前体细胞产生, 参与学习记忆; (3) 发现DNA甲基转移酶Tet3在早期神经元发育中的重要作用; (4) 实现了小鼠和人神经元的体外转分化, 建立了模拟人神经元发育的细胞模型。以上发现丰富和完善了神经发育的表观遗传调控理论, 研究成果发表于*PNAS*、*J Neurosci*等杂志。

神经细胞有效性安全性评估

张东明, 焦建伟*

(中国科学院动物研究所, 北京 100101)

摘要: 中枢神经系统的损伤和神经退行性疾病的移植治疗需要重要的细胞来源。如今, 细胞来源的研究主要集中于诱导多功能干细胞(iPSCs)技术和体细胞直接转分化技术。现已有多种方式实现了高效诱导神经元的转化和成熟, 而且从安全性角度考虑, 转化方式也正逐渐得到完善。根据现在的诱导神经元的研究进展, 对其安全性和有效性进行评估。

关键词: 神经元; 转分化; 细胞移植; 小分子化合物

中图分类号: Q421; Q813 **文献标志码:** A

Efficacy and safety assessment of the nerve cells

ZHANG Dong-Ming, JIAO Jian-Wei*

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Central nervous system injury and neurodegenerative disease needs important source of cell for transplantation treatment. Now, neuron generation research focuses on induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology and direct somatic cell reprogramming. At present, there are several ways to induce somatic cell into mature neurons efficiently. From a security point of view, the neuronal generation approach needs to be improved. According to the current research progress of induced neurons, its safety and efficacy were evaluated.

Key words: neuron; direct reprogramming; cell transplantation; small molecule compound

据统计, 现如今已有超过 3.6 亿的神经疾病患者, 神经损伤及神经退行性疾病早已成为人类健康的一大威胁^[1]。例如, 帕金森氏病、癫痫、阿尔茨海默症等都是由于神经元或胶质细胞损伤及功能障碍造成的中枢神经系统失调。但是, 由于神经元不可复制及再生, 现有的治疗手段都不能从根本上治愈

此类疾病。随着细胞替代疗法概念的不断提出, 为完全治愈此类疾病带来了希望, 已成为当前研究的

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01020301)

*通信作者: E-mail: jwjiao@ioz.ac.cn

热点^[2-6]。细胞替代疗法是指利用获得的具有正常功能的细胞,通过细胞移植的方式去替代受损或退化的细胞,从而改善细胞病变导致的功能失调。对于治疗神经性疾病,获取并移植正常的功能性神经元具有非常深远的意义。目前主要有三种获得功能性神经元的方式:第一,通过诱导胚胎干细胞的分化产生神经元;第二,通过重编程的方式获得 iPSCs (诱导多能干细胞) 或 iNSCs (诱导性的神经干细胞),进而分化产生神经元;第三,通过转分化的方式直接产生诱导性的神经元。

近年来,科学家们对胚胎干细胞或神经干细胞体外定向诱导分化为神经细胞的研究已取得了很大的成功。但是,利用胚胎干细胞进行细胞替代治疗目前面临着细胞来源有限、免疫排斥反应及伦理学问题。目前的研究热点也主要集中于后两种方式。因此,本文将主要介绍后两种获得神经元的方法,并根据现有的研究报道对其安全性和有效性进行评估。

1 iPSCs定向分化为神经细胞

2006年, Takahasi 和 Yamanaka 使用 Oct4、Sox2、Klf4、c-myc 四个干细胞转录因子的组合创造了 iPSCs^[7]。因而,除正常发育、分化获得某种特定细胞外,还可以用个体自身的体细胞诱导为多能性干细胞再分化得到。这样用于生物体本身治疗机体功能障碍,可以完全避免个体基因差异及免疫排斥反应的问题。2013年,斯坦福大学的 Thomas Sudhof 团队发现,在人的 iPSC 细胞中,只需异位表达一个与神经相关的转录因子 Ngn2,就可以快速诱导其分化为有功能的神经元^[8]。诱导分化的神经元可在2周内成熟,且诱导效率达到90%以上。分化后的神经元为混合型,各种神经元亚型与体内分化比例相似。其体外电生理功能成熟,移植入小鼠侧脑室下区后,存活良好并可与体内神经网络整合。

同年,威斯康星大学麦迪逊分校医学和公共卫生学院的张素春教授实验室,研究出了从人的胚胎干细胞及诱导多能干细胞直接定向分化为前脑 γ 氨基丁酸 (GABA) 能中间神经元的方法^[9],整个过程中完全没有用到转基因修饰和细胞筛选,可得到几乎纯度为100%的前脑 GABA 能的中间神经元。首先,将 ES 细胞或 iPSC 细胞以神经干细胞培养条件诱导分化为神经上皮细胞,再使用 sonic hedgehog (SHH) 处理2周,即可几乎完全诱导分化为中间神经元的前体细胞,继续培养诱导分化。6周之内,

细胞即可由多能干细胞分化为纯的、成熟的、有完全功能的前脑 GABA 能中间神经元。2015年12月,张素春教授的实验室再一次利用 iPSC 细胞创建出分泌血清素 (serotonin, 5-羟色胺) 的特定神经细胞^[10]。血清素是一种在大脑中发挥广泛作用的信号化学物质,影响情绪、睡眠、焦虑、抑郁、食欲、脉搏和呼吸,也涉及严重的精神疾病,比如精神分裂症、双相情感障碍和抑郁症。位于大脑后部一个结构中的少量神经元会将血清素递送到大脑的几乎每个部分,血清素因而具备了广泛的影响力。这些细胞表现出对电刺激的预期响应,并产生了血清素。研究表明,这些神经元对一些 FDA 批准的通过血清素通路调节抑郁和焦虑的药物有响应,所以可以确认新细胞能像血清素神经元那样发挥功效。

2 通过直接重编程技术将体细胞诱导产生神经元

2010年2月, Vierbuchen 等^[11]从19个转录因子候选基因库中挑出来了3个基因 *Ascl1*、*Brn2* 和 *Myt1l* (ABM),过表达这三者即可直接转化胚胎及出生后小鼠成纤维细胞为有功能的神经元。此过程不经过中间干细胞的状态,目的细胞可以高表达神经特异性基因,发出动作电位及建立突触联系,这种获得的细胞称为诱导神经元 (induced neuronal, iN cells)。通过 iPSC 细胞技术获得的目的细胞周期在2~6周,而直接重编程技术只需要10~14 d。此外,直接的转化可以避免干细胞非特异性分化所造成的成瘤危险和细胞污染。所以,直接重编程技术在未来的应用中具有巨大的优势。

随着小鼠成纤维细胞被成功诱导为神经元,科学家们开始尝试将相同组合的转录因子应用于人的成纤维细胞转化上。Pang 等^[12]通过筛选发现, *NeuroD1* 与 ABM 组合后即可从人成纤维细胞完全诱导出有功能的神经元,并且进一步的研究表明,诱导成功的神经元在形态、功能等方面都与在体内正常发育成熟的神经元相似。如果诱导的神经元为某一类特异亚型,将对临床应用具有更大的意义。所以,目前新的研究集中于区域特异性和神经递质特异性神经元的获得。Caiazzo 等^[13]发现,新的三转录因子组合 *Ascl1*、*Nurr1* 和 *Lmx1a* 可以转化小鼠及人的成纤维细胞为多巴胺能 (DA) 神经元。此外,国外的几个实验室也成功诱导 *Pitx3* 阳性神经元、运动神经元、纹状体神经元等一些特异亚型的神经元^[14-18]。

尽管在成纤维细胞中过表达各种因子诱导效率非常高及功能显著,但是,各种诱导因子的过表达都是依赖于逆转录病毒或慢病毒载体系统。这些病毒会整合入感染细胞的基因组,因而具有引起插入突变及活化肿瘤相关基因的风险。从安全性角度考虑,这极大地限制了转分化研究在临床上的应用。本实验室在之前的研究过程中利用具有非整合特性的腺病毒载体系统,成功利用转录因子组合 *Ascl1*、*Brn2* 和 *Ngn2* 直接诱导小鼠胚胎及成年成纤维细胞转化为有功能的神经元^[19]。非整合的腺病毒载体系统提供了一个诱导神经元在再生医学应用中的理想方案。由于只要使用了病毒载体过表达目的基因,就会对目的细胞的基因组及蛋白质表达谱产生影响,所以减少转录因子的使用及寻找其替代品意义重大。

3 小分子化合物介导的重编程

小分子化合物是一种调节细胞内蛋白质分子或信号通路活性的分子,只要加入细胞培养环境中即可促进细胞内环境的改变,从而调控基因表达及信号通路的活性,进而影响细胞类型之间的转化。基于小分子化合物的特性,科学家们通过大量地筛选、利用小分子化合物,在替代转录因子的使用、增加转分化效率及诱导特异类型神经元中取得了很大的进步,如将人的成纤维细胞诱导为施万细胞^[20]、痛觉神经元^[21]和感觉神经元^[22]等。小分子化合物的使用不仅减少了转录因子的种类,同时大大提升了转分化效率及诱导神经细胞的成熟,对于应用和治疗有着更重大的意义。而本实验室也鉴定出了一个小化合物 *Forskolin*,当它与 *Ascl1* 腺病毒感染协同作用时,可以非常好地诱导小鼠及人成纤维细胞转化为 iPV 神经元。这种转化得来的 iPV 细胞在体内及体外都表现出有效的抑制性功能,并且可以缓解癫痫小鼠的癫痫发作及改善其行为缺陷。

在诱导多功能干细胞领域,2013年,邓宏魁实验室仅使用了7种小分子化合物就成功将小鼠的成纤维细胞诱导为 iPSCs,这首次证实了无因子转分化的可行性^[23]。随后,人们开始研究单纯的小分子化合物是否能实现神经细胞的直接诱导。终于在2015年8月,分别利用来自健康个体和阿尔茨海默症患者的人类细胞或小鼠细胞,来自中国的两个实验室独立地只采用一种化合物鸡尾酒成功地将皮肤细胞转化成为了神经元。这两项研究均支持了这一观点:纯粹的化学方法是扩大细胞重编程研究的一

种有前景的途径,并有可能避开与更流行的转录因子方法相关的一些技术挑战和安全问题。这两篇研究论文同期发表在 *Cell Stem Cell* 杂志上^[24-25]。第一篇论文来自北京大学的邓宏魁教授,第二篇来自中国科学院上海生命科学研究院和同济大学的裴钢院士。这两篇研究论文均证实,在采用化学鸡尾酒生成的神经元中检测到了与转录因子诱导神经元相似的基因表达、动作电位和突触形成。这一方法使直接的转分化绕过了遗传操控的一些技术挑战和安全问题,使诱导的神经元距离最终的应用更近了一步,在未来可能具有非常广阔的前景。

4 星形胶质细胞的直接转分化

星形胶质细胞由神经干细胞分化而来,并广泛分布于人脑的中枢神经系统,含量达到了80%~90%,是神经组织的支架。星形胶质细胞的存在不仅对神经元的胞体、轴突、突触和血管起保护作用,而且参与血脑屏障的形成。当神经组织受损时,星形胶质细胞会在损伤部位增生,以防止微生物或毒素的扩散,但同时增生的细胞会形成瘢痕阻碍神经元的重建和恢复。因此,如果能够实现星形胶质细胞向神经元的转化,不但能够解决角质瘢痕问题,同时也能解决神经元的再生问题。随着转分化技术的不断成熟,国内外越来越多的实验室开始研究星形胶质细胞向神经元的转化。2013年,Torper等^[26]利用慢病毒携带的转录因子 *Ascl1*、*Brn2* 和 *Myt11* 导入小鼠胚胎的星形胶质细胞中,成功地将其转分化为诱导性神经元,并且将获得的神经元移植入小鼠脑中可以检测到神经电信号,这说明星形胶质细胞来源的神经元也可以在小鼠体内生存并具有功能。此外,许多研究显示通过病毒介导表达特异的转录因子,在体内外都可以实现星形胶质细胞的转化。但在临床上出于安全性考虑,病毒介导的转化仍然受限。

2015年10月,裴钢院士课题组报告称,他们证实在体外采用化学鸡尾酒 VCR (VPA, 3 mmol/L; CHIR99021, 3 μ mol/L; Repsox, 1 μ mol/L) 激活 *NeuroG2* 和 *NeuroD1* 表达,可直接将星形胶质细胞转化为神经元^[27]。同年12月份,Zhang等^[28]报道称,他们使用9种小分子化合物,通过特定的步骤与添加顺序可以将人的星形胶质细胞直接转分化为神经元。诱导的神经元被证实可以在体外培养长达5个月以上,可以形成具有同步动作电位的突触网络,并且移植入小鼠大脑中的诱导性神经元也可以存活1个

月以上。这些研究表明,人们或许可以通过局部传递小分子或全身给药的方式实现星形胶质细胞原位直接诱导成理想细胞,来达到再生医学的最终目标。

5 神经元的移植

临床应用是所有诱导神经元研究的终极目标。诱导的神经元在体内替代受损细胞,从而治疗疾病是人们努力的方向。2015年,一项发表于 *Neuron* 杂志的新研究显示,以加利福尼亚大学欧文分校的 Sunil Gandhi 为首的神经学家将小鼠的胚胎干细胞移植到了其他小鼠的脑内。这些细胞可在脑内被整合,触发大规模神经回路重组,恢复早期发育阶段的高可塑性。神经信号测试和水迷宫测试结果显示,在视觉受损的小鼠体内植入的细胞能使其恢复正常视力^[29]。这证明了神经移植治疗具有非常高的潜力和可靠性。已有的证据也表明,移植从 iPS 细胞诱导分化的神经元可以在小鼠体内存活,且发挥正常功能。那么,如果将诱导神经元移植进入疾病模型小鼠的病灶部位,是否会对疾病有治疗效果呢?科学家们对此也进行了大量的研究。2014年11月,Cunningham 等^[30]报道了人的 iPS 细胞诱导分化得到的 GABA 能中间神经元对癫痫小鼠具有治疗作用。将目的细胞移植入患病小鼠的海马齿状回,移植的细胞可以迁移并整合于功能失调的神经环路,改善小鼠的癫痫发作状态及行为异常。而在本实验室的研究中,通过直接的转分化技术获得的 iPv 神经元在移植入癫痫小鼠海马后,可以稳定而有效地消除癫痫发作和缓解癫痫小鼠相关行为缺陷。

6 展望

目前诱导性神经的研究主要集中于直接的转分化效率及寻求更加安全的诱导方式。单纯的小分子化合物诱导获得的神经元理论上具有很高的安全性,但这种方式转分化的效率较低。同时,单独利用小分子化合物获得特异亚型的神经元也是今后研究的重点。星形胶质细胞直接转分化的成功为再生医学的临床应用提供了另一种很好的方案。但是,脑内原位定点的转分化在安全性方面依然需要大量的研究去验证,以及许多技术难关需要攻克,比如血脑屏障的阻碍。如今的直接转分化技术已经取得了非常大的发展,但在转分化过程中有哪些信号通路在起作用及如何调控这些通路以获得高转化效率和成熟的特异性神经元,人们依然不清楚。在明确整个诱导机制的情况下,这将更有助于对神经元的

安全性和有效性评估。此外,在移植细胞的作用效果方面,大部分的研究实验都是以小鼠作为疾病模型,对于细胞的治疗效果跟踪时间较短,这对于安全性方面很难做出准确的评估。在以后的研究中如果以灵长类动物为疾病模型,并进行长期的跟踪观察,将对以后的临床应用意义更大。

[参 考 文 献]

- [1] Chin JH, Vora N. The global burden of neurologic diseases. *Neurology*, 2014, 83: 349-51
- [2] Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cell to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*, 2001, 292: 1389-94
- [3] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, 410: 701-5
- [4] Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A, et al. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med*, 2004, 10: 42-50
- [5] Rossi F, Cattaneo E. Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3: 401-9
- [6] Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A, et al. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurgery Clin N Am*, 2007, 18: 81-92
- [7] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [8] Zhang Y, Pak C, Han Y, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron*, 2013, 78: 785-98
- [9] Liu Y, Liu H, Sauvey C, et al. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cell. *Nat Protoc*, 2013, 8: 1670-9
- [10] Lu J, Zhong X, Liu H, et al. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 89-94
- [11] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463: 1035-41
- [12] Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 2011, 476: 220-3
- [13] Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 2011, 476: 224-7
- [14] Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 10343-8
- [15] Kim J, Su SC, Wang H, et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 205-18
- [16] Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor

- neurons. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 205-18
- [17] Marro S, Pang ZP, Yang N, et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 374-82
- [18] Victor MB, Richner M, Hermansteyne TO, et al. Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron*, 2014, 84: 311-23
- [19] Meng F, Chen S, Miao Q, et al. Induction of fibroblasts to neurons through adenoviral gene delivery. *Cell Res*, 2012, 22: 436-40
- [20] Thoma EC, Merkl C, Heckel T, et al. Chemical conversion of human fibroblasts into functional Schwann cells. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 539-47
- [21] Wainger BJ, Buttermore ED, Oliveira JT, et al. Modeling pain *in vitro* using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 17-24
- [22] Blanchard JW, Eade KT, Szűcs A, et al. Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons. *Nat Neurosci*, 2015, 18: 25-35
- [23] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341: 651-4
- [24] Li X, Zuo X, Jing J, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 195-203
- [25] Hu W, Qiu B, Guan W, et al. Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 204-12
- [26] Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7038-43
- [27] Cheng L, Gao L, Guan W, et al. Direct conversion of astrocytes into neuronal cells by drug cocktail. *Cell Res*, 2015, 25: 1269-72
- [28] Zhang L, Yin JC, Yeh H, et al. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 735-47
- [29] Davis MF, Figueroa Velez DX, Guevarra RP, et al. Inhibitory neuron transplantation into adult visual cortex creates a new critical period that rescues impaired vision. *Neuron*, 2015, 86: 1055-66
- [30] Cunningham M, Cho JH, Leung A, et al. hPSC-derived maturing GABAergic interneurons ameliorate seizures and abnormal behavior in epileptic mice. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 559-73