

· 综述 ·

谱系重编程治疗脊髓损伤的研究进展

张骏 魏巍 黄亚增 陈锦平

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)常由脊柱骨折、脱位引起,多见于车祸、跌倒和坠下、运动创伤等。SCI 是重要的致残因素,常遗留严重的后遗症,包括运动功能丧失、感觉障碍、大小便失禁、性功能不全、肌肉关节挛缩、褥疮、心理障碍,甚至呼吸衰竭等。美国 SCI 的年发病率为 28/1 000 000 ~ 55/1 000 000, 每位 SCI 患者终生的治疗费用为 50 ~ 200 万美元^[1-3]。外力直接作用可导致脊髓挫伤、受压等原发性损伤,并引起炎症介质、氧自由基、溶酶体酶等的释放以及钙超载和缺血再灌注损伤等继发性损伤,使脊髓神经细胞和胶质细胞凋亡、坏死,有髓轴突脱髓鞘,最后形成胶质瘢痕和空洞,把损伤部位同周围的脊髓组织隔离开来,阻碍轴突生长,这些不可逆的病理过程是导致 SCI 治疗困难的主要原因^[4-6]。

SCI 的治疗尚未取得突破性进展,目前通常的治疗方法包括骨折复位固定、大剂量甲基泼尼松龙冲击疗法,也有学者在临床试验中应用神经节苷脂(ganglioside, GM-1)^[7]、重组蛋白(cethrin)^[8]、利鲁唑(riluzole)^[9]、红细胞生成素^[10]等治疗,但效果并不理想。重建由 SCI 引起的功能障碍必须修复中断的神经通路,移植细胞至 SCI 部位是这一领域当前研究的热点。获得移植细胞的通常策略是,先将普通体细胞转变为多能干细胞,再诱导后者向新的细胞类型分化^[11-13]。近年新出现的另一种策略是,直接将成熟细胞转分化为其它类型的功能细胞或祖细胞,即谱系重编程(lineage reprogramming, LR)^[14],又称为直接转分化(direct conversion)。LR 的出现为 SCI 的修复带来了新的曙光。

LR 的定义和分类

普遍认为,要使一种类型的已分化细胞转变为另一种类型,往往需要通过核移植、细胞融合或者借助于某些特定的因子使之回到一个未分化的阶段^[15]。2008 年 Zhou 等^[16]发现,在未回到诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)状态的情况下,将一种已分化的成体细胞原为转变成另一种类型的成体细胞。2010 年 Vierbuchen 等^[17]也成功绕过诱导多功能干细胞,首次在体外将小鼠胚胎和成体成纤维细胞直接转化为具有功能的神经元。

上述在不同类型的成熟细胞间实现功能直接转化的过程,属于 LR 的范畴。而 LR 包括将成熟细胞转分化为其它类型的功能细胞或祖细胞的两种过程^[14]。由于其过程中并未涉及到去分化为 iPSCs 的过程,LR 也将成为继 Yamanaka 的突破之举

之后新的研究热点。

LR 的起源及研究进展

一、LR 的起源

多年来,人们一直认为细胞分化是一个不可逆的单向过程,但随后一些研究却发现,即使是已完全分化的细胞也能够去分化,重新回到一个类似早期胚胎细胞的多能状态,如被视为再生医学研究领域的里程碑式突破的 iPSCs 的研究^[18-19],体细胞转化而来的 iPSCs 在体外经诱导成为成熟的功能细胞后可应用于临床。正当大部分学者将目光聚集在 iPSCs 的时候,另一种可使成熟细胞退回到祖细胞状态甚至直接转变细胞类型的策略开始引起了人们的注意。早在 1973 年 Eguchi 等^[20]就提出了转分化(transdifferentiation)的概念,即一种分化完全的细胞丢失其原有表型而转变为其它类型细胞的现象。2002 年 Brookes 等^[21]发现,成年蝾螈四肢再生过程中,皮肤、肌肉和软骨细胞均先去分化成为祖细胞,再分化形成新的四肢。2008 年 Orkin 等^[14]首次将这类重编程方式称为 LR,经过此种转变,许多表观遗传标记得以保存,且获得的祖细胞或成熟细胞可直接用于临床。

二、体外 LR 研究

1987 年 Davis 等^[22]使用骨骼肌细胞发育过程中的关键转录因子 MyoD 将胚胎成纤维细胞转变为成肌细胞;1990 年 Choi 等^[23]使用 MyoD 成功将胚胎成纤维细胞、成软骨细胞和视网膜上皮细胞转变为具收缩特性的肌细胞。人们猜想这种可转化现象的原因是被转化的双方是属于同一胚层的细胞系,具有“亲缘”关系。循此思路,2004 年 Xie 等^[24]采用 C/EBP 激活 B 淋巴细胞,使其转变为巨噬细胞。2006 年 Laiosa 等^[25]采用 C/EBP- α 及 PU.1 将 T 前体细胞转变为巨噬细胞及树突状细胞。2008 年 Feng 等^[26]采用 C/EBP 及 PU.1 将人皮肤成纤维细胞转化为巨噬细胞,证明跨谱系的直接转分化是可能的。2010 年 Ieda 等^[27]采用 3 种心脏发育调控因子(Gata4、Mef2c 和 Tbx5)将小鼠心脏或皮肤成纤维细胞转化为心肌样细胞。2010 年 Szabo 等^[28]用 OCT4 加特定细胞因子,将人皮肤成纤维细胞直接转化为多种血液细胞,包括粒细胞、单核细胞、巨核细胞以及红细胞。2011 年 Efe 等^[29]采用经典 iPSCs 四因子(Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4)一过性提高成纤维细胞的表现遗传不稳定性,然后用定向分化条件诱导处于某种中间态的细胞转化为心肌细胞。

三、体内 LR 研究

体内 LR 的研究有 2 个杰出成果,它们为找出决定细胞系转化的主调控基因打下了基础。一项研究成果是体内 LR 恢复了耳聋成年天竺鼠的听力^[30]。毛细胞是听觉的感觉细胞,当声波到达内耳时,位于基底膜上的螺旋器毛细胞的静纤毛弯曲,从而产生电信号。如果毛细胞受损或缺乏,声波和大脑听觉中心的这种连接就会被破坏,从而导致听力丧失。毛细胞的持久性变性是导致耳聋的主要原因。此前已有体内和体外实验证实了

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.03.024

基金项目:浙江省卫生厅医药卫生一般研究计划(2012KYB022);浙江省中医药科学研究基金计划(2012ZB015);浙江省医学高等专科学校自然科学基金项目(2011XZB01)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院骨科

通信作者:陈锦平,Email:spinecjp@yahoo.com.cn

内耳非感觉上皮细胞通过异位表达毛细胞发育过程中的关键转录因子 *Atoh1* (又称为 *Math1*) 转变为毛细胞^[31-32]。在这些前期研究的基础上,2005 年 Izumikawa 等^[30]把携带有听觉毛细胞发育过程中的关键转录因子 *Atoh1* (又称为 *Math1*) 的腺病毒注入成年耳聋豚鼠内耳中阶的非感觉上皮细胞中,8 周后发现用 *Atoh1* 处理过的豚鼠内耳中形成了新的毛细胞,听力测试表明豚鼠的听力有所恢复。另一项研究成果是在小鼠体内将胰腺外分泌细胞直接转分化为 β -胰岛细胞。2008 年 Zhou 等^[16]从一系列候选因子中筛选出 9 个对于 β -胰岛细胞发育必不可少的基因,并通过腺病毒以不同的组合方式将它们植入到成年小鼠的胰腺内,结果发现,以 *Ngn3*、*Pdx1* 和 *Mafa* 三个因子为主的诱导体系可将 20% 的胰岛外分泌细胞转化为 β -胰岛细胞;将实验中得到的 β -胰岛细胞与天然的 β -胰岛细胞进行比较,发现前者并不能被原有胰岛体系或其它内分泌细胞和血管系统所接纳,但均与周围血管联系密切,据推测,这是为了便于新生细胞感觉周围环境的血糖水平并适时地释放胰岛素。这项研究成果为糖尿病患者带来了福音。

LR 使体细胞向神经细胞转分化及 LR 修复 SCI 的可行性

2010 年,LR 的研究取得新进展,Wernig 研究小组首先选择了 19 个与神经系统发育有关的基因,利用慢病毒将其导入实验小鼠胚胎的成纤维细胞^[17],32 d 后,其中一些成纤维细胞开始向神经细胞转化,随后再从中筛选出 3 个基因 (*Ascl1*、*Bm2* 和 *Myt1l*) 转导至成年小鼠尾部的成纤维细胞;1 周内发现,约有 20% 的成纤维细胞转变为神经细胞,这些新生的神经细胞不仅表达多种神经元特有的蛋白,还可产生动作电位,并与其它神经细胞形成功能性突触连接并传导信号。2011 年 Wernig 研究小组在原有的 3 个转录因子基础上,添加了一个螺旋环螺旋转录因子 *NeuroD1*,成功地将人类胚胎及新生儿的皮肤纤维细胞成功地诱导为功能性神经细胞^[33],这些细胞不仅显示典型的神经元形态,表达多种神经元标志蛋白,并且能够产生动作电位;将这些神经细胞与原代小鼠皮质神经元进行共培养发现,它们能够形成神经突触并传导信号。2011 年 Tursun 等^[34]发现,异位表达秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 转录因子 *CHE1* 可以使线虫的生殖细胞直接分化为不同类型的神经元细胞 (谷氨酸能、胆碱能、GABA 能),上述转分化过程需要去除组蛋白伴侣 LIN-53,后者是几个组蛋白组装和修饰复合体的组成成分。基于这一研究发现,研究人员认为,利用生殖细胞可以直接“生产”特定的终末分化的神经元细胞。最近的一项研究在线虫体内直接将直肠细胞转化成了运动神经细胞^[35],这是第 1 例体内直接跨细胞谱系的直接转分化证据。

虽然到目前为止仍缺乏有关 LR 的应用研究,特别是缺乏在人体内直接将体细胞转分化为神经元和神经胶质细胞来治疗 SCI 的直接研究成果。但 LR 使体细胞向神经细胞转分化的研究已取得突破性进展,且干细胞及 iPSCs 的细胞移植治疗 SCI 的实验研究也比较成熟,而与干细胞及 iPSCs 相比,LR 可在体内将某种细胞直接转化为所需要的靶细胞,它不存在体外操作的复杂性,又规避了倒退回多潜能状态带来的风险,也不存在伦理、免疫排斥等问题。因此,有理由相信,LR 在 SCI 的修复中有着非常好的应用前景。

结论与展望

2009 年 1 月美国食品及药物管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准了 Geron 公司用来自于人类胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, h-ESCs) 的少突细胞祖细胞治疗 SCI 的临床 I 期试验,这对于细胞移植治疗 SCI 具有重要意义。虽然移植后干细胞的活性、成瘤的风险、免疫抑制剂的长期使用以及干细胞来源所涉及的伦理、宗教等问题阻碍了干细胞的发展,iPSCs 的研究也陷入了瓶颈,但随着 LR 的研究进展,相信这些问题都将得到解决。虽然概念上 LR 有明显优于干细胞及 iPSCs 之处,但它并不具有普适性,界定大量的成熟细胞之间转化的可能性、所需要的因子以及操作方法将是一个很繁琐的过程,而且最终的转化只能是在特定细胞之间。成熟细胞的表现遗传稳定性远大于多潜能细胞,但目前对成熟细胞表现遗传知之甚少,如何克服这种稳固的表现遗传而又不到回到多潜能状态,并重塑所需要的成熟靶细胞表现遗传,还需要进一步研究。

将患者自身的体细胞直接转化成多种功能细胞以用于临床治疗是再生医学的梦想。在过去的 2 年间,全世界对于该领域的研究热情空前高涨,学者们尝试了多种策略去启动重编程事件以获得新的细胞类型。作为诱导重编程的一项新策略,对 LR 的系统研究才刚刚起步,随着 LR 研究的进一步深入,相信 LR 在再生医学领域的研究将会取得更大的进展。

参考文献

- [1] Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ*, 2002, 26: 238-255.
- [2] McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet*, 2002, 359: 417-425.
- [3] Dietz V, Curt A. Neurological aspects of spinal-cord repair: promises and challenges. *Lancet Neurol*, 2006, 5: 688-694.
- [4] Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*, 2005, 30: S3-S13.
- [5] Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, 2001, 26: S2-S12.
- [6] Thuret S, Moon LDF, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7: 628-643.
- [7] Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. Recovery of motor function after spinal-cord injury: a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. *N Engl J Med*, 1991, 324: 1829-1838.
- [8] Baptiste DC, Tighe A, Fehlings MG. Spinal cord injury and neural repair: focus on neuroregenerative approaches for spinal cord injury. *Expert Opin Invest Drug*, 2009, 18: 663-673.
- [9] Killestein J, Kalkers NF, Polman CH. Glutamate inhibition in MS: the neuroprotective properties of riluzole. *J Neurol Sci*, 2005, 233: 113-115.
- [10] Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*, 2002, 8: 495-505.
- [11] 张骏, 邵海宇, 陈锦平. 诱导多功能干细胞在脊髓损伤修复中的作用. *中华骨科杂志*, 2010, 30: 213-215.
- [12] 翁南川, 张骏, 詹仁雅. 诱导多功能干细胞-帕金森病治疗的未来. *中华神经外科杂志*, 2010, 26: 1144-1146.

- [13] 容威,刘忠军. 诱导多功能干细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展与展望. 中华外科杂志, 2011, 49:269-271.
- [14] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell, 2008, 132:631-644.
- [15] Blleloch R. Regenerative medicine: short cut to cell replacement. Nature, 2008, 455:604-605.
- [16] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. Nature, 2008, 455:627-632.
- [17] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature, 2010, 463:1035-1041.
- [18] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell, 2006, 126:663-676.
- [19] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 2007, 131:861-872.
- [20] Eguchi G, Okada TS. Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured in vitro: a demonstration of a switch of cell types in clonal culture. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70:1495-1499.
- [21] Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3:566-574.
- [22] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell, 1987, 51:987-1000.
- [23] Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, et al. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87:7988-7992.
- [24] Xie H, Ye M, Feng R, et al. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. Cell, 2004, 117:663-676.
- [25] Laïosa CV, Stadtfeld M, Xie H, et al. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP α and PU. 1 transcription Factors. Immunity, 2006, 25:731-744.
- [26] Feng R, Desbordes SC, Xie H, et al. PU. 1 and C/EBP α /beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105:6057-6062.
- [27] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell, 2010, 142:375-386.
- [28] Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. Nature, 2010, 468:521-526.
- [29] Efe JA, Hilcove S, Kim J, et al. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. Nat Cell Biol, 2011, 13:215-222.
- [30] Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, et al. Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. Nat Med, 2005, 11:271-276.
- [31] Zheng JL, Gao WQ. Overexpression of Math1 induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears. Nat Neurosci, 2000, 3:580-586.
- [32] Kawamoto K, Ishimoto S, Minoda R, et al. Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs in vivo. J Neurosci, 2003, 23:4395-4400.
- [33] Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. Nature, 2011, 476:220-223.
- [34] Tursun B, Patel T, Kratsios P, et al. Direct conversion of *C. elegans* germ cells into specific neuron types. Science, 2011, 311:304-308.
- [35] Richard JP, Zuryn S, Fischer N, et al. Direct in vivo cellular reprogramming involves transition through discrete, non-pluripotent steps. Development, 2011, 138:1483-1492.

(修回日期:2012-12-28)

(本文编辑:汪 玲)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对论文中实验动物描述的要求

根据国家科学技术部 1988 年颁布的《实验动物管理条例》和卫生部 1998 年颁布的《医学实验动物管理实施细则》,《中华物理医学与康复杂志》对论文中有关实验动物的描述,要求写清楚以下事项:①品种、品系及亚系的确切名称;②遗传背景或其来源;③微生物检测状况;④性别、年龄、体重;⑤质量等级及合格证书编号;⑥饲养环境和实验环境;⑦健康状况;⑧对实验动物的处理方式。

医学实验动物分为四级:一级为普通级;二级为清洁级;三级为无特定病原体(SPF)级;四级为无菌级。卫生部级课题及研究生毕业论文等科研实验必须应用二级以上的实验动物。