

## 诱导多能干细胞在脑血管病康复中的应用及研究进展

黄丹霞 黄赛娥

脑血管病又称脑血管意外或脑卒中,是指脑血管破裂出血或血栓形成引起的以脑部出血性或缺血性损伤症状为主要临床表现的一组疾病。目前,脑卒中是导致世界人口死亡的第二大疾病<sup>[1]</sup>。脑血管病高致残率和高死亡率的特点已严重危害到人类的健康,虽然现代诊疗技术不断进步与提高,但预防和治疗脑血管病的效果却不理想。随着干细胞工程的发展,诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPS)作为一种体细胞重编程技术,为脑血管病的治疗开辟了新途径。

### iPS 的发现与制备过程

iPS 是指将体细胞进行重编程,转化为具有胚胎干细胞(embryonic stem cells,ES)特性和功能的多能干细胞。iPS 是由 Takahashi 等<sup>[2]</sup>在 2006 年首次发现的,他们利用病毒载体介导特定转录因子(Sox2、Oct4、Klf4 及 c-Myc)表达,从而使小鼠体细胞重编程,获得类似于干细胞特性的克隆细胞,并将此类细胞命名为 iPS。2007 年,iPS 技术成功诱导出人 iPS,在医学生物界掀起了研究热潮,并陆续被用于细胞替代治疗、基因治疗、发育生物学研究、药物药理学及毒理学研究等多个领域。

iPS 的制备过程大致分为以下 4 个步骤:①分离和培养初始的体细胞成为重编程靶细胞;②构建携带转录因子的载体,并将其导入靶细胞;③将靶细胞置于专用的培养系中培养,并加入促重编程物质;④iPS 的筛选及鉴定。其中,被用于重编程的载体有逆转录病毒、慢病毒、腺病毒载体、质粒、蛋白质等,影响重编程过程的有小分子化合物、microRNA 等,其可在一定程度上促进 iPS 的转录,提高诱导率。

### iPS 与 ES 比较

在干细胞移植疗法研究中,iPS 被认为是最理想的选择之一,它不仅具有类似 ES 的自我更新能力及分化成各种器官的潜能,还可有效避免 ES 移植潜在的免疫排斥反应。但 iPS 具有的功能特性是否与 ES 完全相同尚还在研究中。Takahashi 等<sup>[3]</sup>发现 iPS 有 1200 多个基因与 ES 不同,但在多能干细胞特异性基因和端粒酶活性等方面却与 ES 相似。Chin 等<sup>[4]</sup>利用基因表达谱分析发现,在早期传代中 iPS 与 ES 的基因表达存在部分差异,但是经过扩展传代,iPS 的基因表达与 ES 越来越相似,表明早期传代的 iPS 和 ES 表达差异可在延长传代后得到解决。

iPS 与 ES 之间的基因表达差异并不能证明 iPS 存在缺陷,因为在不同 ES 系之间也存在着差异,但这并不影响分化细胞

的功能。Wang 等<sup>[5]</sup>研究发现,iPS 移植较 ES 移植能更好地恢复脑缺血模型小鼠的代谢活动,iPS 移植组的治疗反应较 ES 移植组更稳定,能表达出大量的神经元、星形胶质细胞和内皮细胞。但这一研究尚不足以证实 iPS 较 ES 有更好的分化及基因表达功能,仍需要进一步探讨两者存在的临床应用差异。

### iPS 在脑血管病中的应用

iPS 在脑血管病研究中拥有广阔的前景。利用自体细胞诱导的 iPS 可建立具有患者特异性的疾病模型,进而找到疾病发生、发展的本质,为患者筛选最合适的药物。借助这一优势,研究者可利用 iPS 解决较多脑血管病难题。

#### 一、iPS 在缺血性脑血管病中的应用

急性缺血性脑卒中占全部脑卒中的 60%~80%,是常见的脑卒中类型之一<sup>[6]</sup>。近年来,学者们研究 iPS 在缺血性脑血管病中的作用,发现 iPS 诱导后的细胞移植能有效提高脑缺血区的神经功能,改善肢体功能状况。

目前,iPS 已被证实可定向分化成多种神经类细胞,如神经干细胞(neural stem cell,NSC)、神经前体细胞(neural progenitor cell,NPC)、星形胶质细胞、少突胶质细胞等。许晶等<sup>[7]</sup>利用单层贴壁的培养方法,在无血清的情况下将脑膜细胞来源的 iPS 诱导分化成神经样细胞,通过细胞免疫荧光技术可以检测到大量 Pax6 和 Nestin 阳性的 NPC,且这些前体细胞能够分化形成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞 3 类中枢神经系统细胞。Mohamad 等<sup>[8]</sup>在无饲养层和无血清条件下也能够将无载体和无转录基因转录的人 iPS 诱导成 NPC,此外,在维甲酸和无血清培养基条件下还可将人 iPS 定向诱导为 NSC。Yuan 等<sup>[9]</sup>将诱导的 NSC 移植至脑缺血小鼠模型中,发现 NSC 分化成为神经元和星形胶质细胞,1 周后表达  $\beta$ -微管蛋白和巢蛋白,2 周后表达神经胶质纤维酸性蛋白质(glial fibrillary acidic protein,GFAP),3 周后利用抓绳、悬吊和水迷宫试验评价发现小鼠的运动感觉功能显著改善。关于 iPS 向 NSC 定向分化的机制,有研究认为 Notch 信号在整个过程起着重要的调控作用,而与 Notch 信号密切相关的 miRNAs(mir-9、-34a 及 mir-200b)可能通过调控 Notch 信号参与人 iPS 向 NSC 定向分化的过程<sup>[10]</sup>。

研究发现,细胞替代疗法可以通过减轻炎症反应、增加神经营养、减少细胞凋亡、增强内源性恢复过程,进而显著改善缺血性或出血性脑损伤动物的相关功能<sup>[11]</sup>。而 iPS 技术作为一种细胞替代疗法,也被证实可以明显改善缺血性脑血管病动物模型的肢体功能<sup>[8-10,12-13]</sup>。Mohamad 等<sup>[8]</sup>将 iPS 诱导成的 NPC 移植到脑缺血模型小鼠后,利用内源信号光学(intrinsic optical signal,IOS)功能成像发现,细胞移植可以强化啮齿动物大脑接收胡须感觉输入的区域——体觉皮质,进而改善脑局部血流,促进神经与血管再生。

有学者认为,进行 iPS 移植治疗后,脑缺血动物模型行为功

能改善的原因并非是由于新神经元替换了损伤和凋亡的神经元,而是因为血管内皮生长因子水平得到提高,从而增强了内源性神经的可塑性<sup>[13-14]</sup>。Ok<sup>[13]</sup> 将人 iPS 诱导的类神经上皮干细胞移植到小鼠和大鼠脑卒中模型中,发现其不仅可以促进缺血性脑卒中模型小鼠的前爪运动功能恢复,还可接受移植模型从大脑中传来的外周刺激,且纹状体的移植神经元可将轴突伸至苍白球等区域。Chang 等<sup>[12]</sup> 研究认为,移植细胞转移至缺血区域并形成神经组织,减少了炎症反应、神经胶质增生和细胞凋亡,促进了内源性神经修复过程,进而改善神经功能。

## 二、iPS 在出血性脑血管病中的应用

出血性脑血管病大约占脑血管病的 10%~30%<sup>[15]</sup>。与缺血性脑血管病比较,出血性脑血管病具有更高的致残率和致死率。出血性脑血管病除发病初期时的脑出血外,随后还会出现出血区域的脑组织缺血、缺氧、炎症反应、神经细胞变性、坏死及凋亡等一系列病理改变。目前,关于 iPS 移植治疗出血性脑血管病的研究仍处于探索阶段,其具体机制及治疗效果尚未完全阐明。

Qin 等<sup>[16-17]</sup> 研究发现,将脑出血患者 iPS 诱导出的神经上皮样干细胞移植至脑出血模型小鼠中,发现移植细胞可以生存并转移至血肿区,并在血肿区域形成 NSC、神经元、星形胶质细胞。采用改良神经损害程度评分(modified neurological severity score, mNSS)和改良肢体平衡试验(modified limb placing test, MLPT)发现,细胞移植可显著促进神经功能恢复,并推测其机制是受到损伤的脑组织神经元被替换和神经营养因子的分泌增加。廖伟等<sup>[18]</sup> 将脑出血患者的 iPS 直接移植到脑出血大鼠模型中,通过 mNSS 发现,大鼠的神经功能得到改善,推测其可能机制是能够减少神经细胞凋亡,显著下调出血区周围的 caspase-3 表达。

## iPS 研究存在的问题

### 一、安全性

由于 iPS 技术中利用到病毒载体,将病毒随机插入基因组可能会引起基因突变及原癌基因激活,从而导致受体肿瘤的形成。此外,肿瘤相关基因 Klf4 及 C-myc 的引入也增加了致癌率。Kim 等<sup>[19]</sup> 和 Zhou 等<sup>[20]</sup> 均成功地利用蛋白质诱导了体细胞重编程,大大提高了 iPS 的安全性,使 iPS 的致癌性有望被克服。目前,在多数利用人 iPS 移植治疗脑血管病动物的研究中,并未普遍发现肿瘤形成,但由于动物实验的观察时间较短,并不能证明 iPS 的植入是完全无致癌性的,故关于 iPS 的安全性问题仍需进一步研究和验证。

### 二、低诱导率

自 iPS 被发现以来,一直存在着诱导率低的问题。经过探索发现,通过改变转录因子的组合、加入小分子化合物等方法均可提高 iPS 的重编程效率。Judson 等<sup>[21]</sup> 发现 ESCC 家族的 microRNA(如 miR-294)可替代转录因子诱导 iPS,并能明显提高重编程效率。降低培养环境的氧浓度<sup>[22]</sup>、将维生素 C 加入到培养系中<sup>[23]</sup> 等方法均可以提高 iPS 的诱导率,但 iPS 的诱导率大多在 0.01%~0.02% 内,仍处于低下水平,有待进一步提高。

### 三、机制不完善

iPS 作为一种成体细胞的重编程干细胞,在多能性及细胞来源方面具有一定的优势,但其具体的治疗效果及作用机制尚

处于探索阶段。在 iPS 技术中对转录因子的精确调控及转录因子参与重编程的机制仍是未知的,目前尚无确切的指南来指导如何利用 iPS 移植疗法治疗脑血管疾病。

## 展望

近年来,iPS 受到越来越多的学者关注,引起了医学研究者极大的兴趣。尽管 iPS 治疗技术仍存在着一些尚未被攻克的问题,但 iPS 凭借其突显的优势及具有分化成多种器官的潜能,可在一定程度上避免伦理学和免疫排斥等问题,在未来可以为脑血管疾病患者乃至全人类带来较多益处。纵观 iPS 在短时间内取得的一系列突破,相信随着研究的不断深入,更安全且有效的 iPS 治疗技术将会被开发、利用。

## 参 考 文 献

- [1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data[J]. Lancet, 2006, 367(9524): 1747-1757. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68770-9.
- [2] 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.
- [3] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [4] Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1): 111-123. DOI: 10.1016/j.stem.2009.06.008.
- [5] Wang J, Chao F, Han F, et al. PET demonstrates functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat model of cerebral ischemic injury[J]. J Nucl Med, 2013, 54(5): 785-792. DOI: 10.2967/jnumed.112.111112.
- [6] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 146-153. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2010.02.022.
- [7] 许晶, 王皓, 梁涛, 等. 体外诱导脑膜来源的 iPS 形成神经样的细胞[J]. 科学通报, 2011, 56(8): 567-572.
- [8] Mohamad O, Drury-Stewart D, Song M, et al. Vector-free and transgene-free human iPS cells differentiate into functional neurons and enhance functional recovery after ischemic stroke in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(5): 64160. DOI: 10.1371/journal.pone.0064160.
- [9] Yuan T, Liao W, Feng NH, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurological function in a rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3): 73. DOI: 10.1186/scrt224.
- [10] 冯年花, 谢安, 姜远蕾, 等. 人诱导性多能干细胞向神经干细胞分化的方法探讨[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8): 1662-1664. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2010.044.
- [11] Onteniente B. The multiple aspects of stroke and stem cell therapy[J]. Curr Mol Med, 2013, 13(5): 821-831.
- [12] Chang DJ, Lee N, Park IH, et al. Therapeutic potential of human in-

- duced pluripotent stem cells in experimental stroke[J]. Cell Transplant, 2013, 22(8): 1427-1440. DOI: 10.3727/096368912X657314.
- [13] Oki K, Tatarishvili J, Wood J, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain[J]. Stem Cells, 2012, 30(6): 1120-1133. DOI: 10.1002/stem.1104.
- [14] Yuan T, Liao W, Feng NH, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurologic function in a rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(3): 73. DOI: 10.1186/scrt224.
- [15] Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets[J]. Lancet Neurol, 2012, 11(8): 720-731. DOI: 10.1016/S1474-4422(12)70104-7.
- [16] Qin J, Gong G, Sun S, et al. Functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat hemorrhagic stroke model[J]. Neurosci Lett, 2013, 25(1): 70-75. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.08.047.
- [17] Qin J, Song B, Zhang H, et al. Transplantation of human neuro-epithelial-like stem cells derived from induced pluripotent stem cells improves neurological function in rats with experimental intracerebral hemorrhage[J]. Neurosci Lett, 2013, 25(1): 95-100. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.05.007.
- [18] 廖伟, 汪泱, 娄远蕾, 等. 人诱导性多能干细胞向神经干细胞分化过程中相关 microRNA 的表达变化[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1): 3-5. DOI: 10.3969/j.issn.1674-1129.2011.01.002.
- [19] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 472-476. DOI: 10.1016/j.stem.2009.05.005.
- [20] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(5): 381-384. DOI: 10.1016/j.stem.2009.04.005.
- [21] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(5): 459-461. DOI: 10.1038/nbt.1535.
- [22] Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, et al. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 3(3): 237-241. DOI: 10.1016/j.stem.2009.08.001.
- [23] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6(1): 71-79. DOI: 10.1016/j.stem.2009.12.001.

(修回日期: 2015-10-20)

(本文编辑: 凌 琛)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益, 现将中华医学会系列杂志对一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下:

1. 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处, 但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要重复投稿, 应向有关期刊编辑部做出说明。

2. 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表, 除非文种不同, 否则不可再将该文投寄给他刊。

3. 请作者所在单位在来稿介绍信中注明文稿有无一稿两投问题。

4. 凡来稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿, 则表明稿件仍在处理中, 作者欲投他刊, 应事先与该刊编辑部联系并申述理由。

5. 编辑部认为文稿有一稿两投嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核实后再通知作者, 同时立即进行退稿处理, 在做出处理决定前请作者就此问题做出解释。期刊编辑部与作者双方意见发生分歧时, 应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

6. 一稿两用一经证实, 期刊编辑部将择期在杂志中刊出其作者姓名和单位及撤销该论文的通告; 对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿, 中华医学会系列杂志 2 年内将拒绝其发表; 并就此事件向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中华医学会杂志社