

综述

促进诱导多能干细胞向神经系统细胞分化的研究现状

State of the art review of pluripotent stem cell differentiating into nervous system cells

杨 阳, 刘 斌, 戎利民

(中山大学附属第三医院脊柱外科 510630 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.06.13

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-06-0552-04

诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 是一种应用相关转录因子将细胞重编程、逆转其发育潜能而得到的类似于胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESC) 的一种多能性干细胞。2006 年, Takahashi 与 Yamanaka^[1]将 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 种因子转移至小鼠成纤维细胞, 首次获得 iPSC。由于其来源于自身细胞, 自体移植时不涉及伦理问题, 无免疫原性, 在替代治疗、药物筛选、疾病建模等方面均可以发挥潜在的巨大优势^[2]。iPSC 作为一种多能干细胞, 在适当条件下可实现神经分化, 即定向分化为神经干细胞 (neural stem cell, NSC)、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等组成神经系统的各种细胞^[3,4], 因而成为治疗神经系统疾病的理想选择。有学者总结了经典的胚胎干细胞神经分化的方法^[5-7], 这也成为确立 iPSC 神经分化方法的重要参考。但目前 iPSC 神经分化效率明显低于 ESC, 仅为 5%, 且机制不甚清楚^[8-10]。因而如何促进其神经分化, 最终发挥治疗潜能成

为临床应用的一个挑战。为总结促进 iPSC 神经分化的各种方法, 更好地生成神经细胞, 笔者就此综述如下。

1 iPSC 神经分化过程

多数文献中所报道的人和鼠类 iPSC 神经分化方法大体上需经历 4 个阶段^[3,11,12]: 首先悬浮培养形成拟胚体 (embryonic body, EB); EB 进一步分化为玫瑰花环样结构 (rosette structure); 后者被机械性分离, 并扩增形成神经球 (neurosphere); 神经球是 NSC 的聚集体, 悬浮生长呈球状, 将其置于纤维连接蛋白等基质包被的培养板中, 加入向神经元、神经胶质细胞分化的特定培养基即可以得到目的细胞。目前, 还出现了无需经过 EB 阶段的 iPSC 神经分化方法^[4]: 将 iPSC 置于添加或不添加 noggin 等分化刺激因子的培养基中, 直至单层神经上皮细胞 (neuroepithelial cell) 形成, 再使用机械法分离上述细胞, 置于神经球培养基中以形成神经球, 最后再进行向神经元或神经胶质细胞的定向分化。目前各种促进 iPSC 神经分化的方法多是作用于上述不同阶段而实现的。

2 神经上皮干细胞在 iPSC 神经分化中的作用

神经上皮干细胞 (neuroepithelial stem cell, NES),

第一作者简介: 男 (1987-), 硕士研究生, 研究方向: 干细胞基础研究

电话: (020)85252900 E-mail: yanghaiyang1987@sina.com

通讯作者: 戎利民 E-mail: ronglimin@21cn.com

synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury[J]. Neuroscience, 1994, 61(4): 719-726.

26. Suzuki T, Tatsuoka H, Chiba T, et al. Beneficial effects of nitric oxide synthase inhibition on the recovery of neurological function after spinal cord injury in rats [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001, 363(1): 94-100.
27. Palluy O, Rigaud M. Nitric oxide induces cultured cortical neuron apoptosis[J]. Neurosci Lett, 1996, 208(1): 1-4.
28. Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, et al. Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendro-

cytes[J]. Neuroscience, 1995, 65(2): 531-539.

29. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(16): 7162-7166.

(收稿日期: 2012-08-28 末次修回日期: 2012-11-20)

(英文编审 蒋 欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)

亦称神经上皮细胞,其在胚胎发育中被认为是最原始的 NSC,具有较好的自我复制能力和多向分化潜能^[13]。iPSC 作为一种多能干细胞,理论上也可经过 NESC 阶段向各种神经细胞分化。Falk 等^[14]指出,人 iPSC 源性 NESC 具有很好的扩增性、稳定性和分化潜能,具体来说,它可以稳定地向功能性神经元和神经胶质细胞分化;在加入成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF2) 和表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 时具有持续的扩增性。NESC 即使长期传代也能保持典型的形态学特征、稳定的分化潜能和基因表达谱。同时原始神经上皮细胞的时间、空间反应性对于神经元及神经胶质细胞大量生成有着显著影响^[15]。可见 NESC 是 iPSC 神经分化过程中的重要中间态细胞,但目前对其生物学特征及功能研究较少,需要进一步深入研究。

3 小分子化合物和细胞因子在 iPSC 神经分化中的应用

维甲酸 (retinoic acid, RA) 和音猬因子 (sonic hedgehog, SHH) 是目前常用促神经分化的小分子化合物^[9,11,16]。RA 在神经细胞的发育、再生和维持中发挥重要的作用,它通过调节某些转录因子的表达来调控神经分化进程^[15]。SHH 能够通过塑形早期胚胎特别是腹侧神经管加强 RA 的促分化作用^[17,18]。但随着研究的深入,目前对 RA 和 SHH 的作用已有了新的认识。Hester 等^[19]指出,仅使用 RA 及 SHH 不能完全促进 iPSC 向具备电生理活性的运动神经元转化,他们利用腺病毒基因转导系统,成功地将神经原质蛋白 2 (neurogenin 2, Ngn2) 基因、islet-1 (Isl-1) 基因、LIM/同源异型盒蛋白 3 (LIM/homeobox protein 3, Lhx 3) 基因转入到前体细胞内,从而在人 iPSC 中获得了超过 60% 的神经诱导效率,同时诱导时间大为缩短。Patani 等^[20]报道,激活 SHH 的同时抑制 activin/nodal 信号通路可在不需要外源性 RA 的条件下有效促进脊髓运动神经元的形成。

除了 RA 及 SHH,一些其他的细胞因子及小分子化合物在 iPSC 神经分化中也得到应用。神经营养因子可以通过特异性受体促进神经元存活及神经突触生长^[18],如脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 可以促进轴突的延长。此外,胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)、睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor)、神经营养因子 3 (neurotrophin 3, NT3)、环腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 也有类似作用^[21-23]。Jensen 等^[24]在 iPSC 神经分化过程中添加 IGF1、BDNF、GDNF、cAMP 等因子后成功地将人类 iPSC 转化为早期阶段的 NSC,并第一次将人类 iPSC 源性 NSC 移植入卒中大鼠模型中,发现其可以在大鼠缺血损伤的脑组织中存活,且主要分化为神经元。另外,生长源性神经因子 (growth-derived neural factor) 也被证实可促进神经分化^[9]。Martinez 等^[25]证实,EGF

和 FGF2 是促进人 iPSC 分化为神经祖细胞的主要作用因子。Yao 等^[12]使用含有 20ng/ml 碱性成纤维因子 (basic fibroblast growth factor, FGF2) 和 EGF 的神经干细胞球培养基与小鼠 EB 共培养 4d,最终获得了神经祖细胞,在撤除生长因子后这些小鼠神经祖细胞实现了向各种成熟神经细胞的分化。Martinez 等^[25]同时指出,胰岛素可促进细胞增殖,转铁蛋白有助于成熟神经元的增殖及存活,丁二胺有助于轴突再生,硒元素可减轻兴奋毒性的影响,而由它们化合而成的 N2 添加物能够有效地促进神经分化。B27 添加物也被证实具有类似作用。目前都得到了广泛的应用。

4 信号通路调节剂和物理刺激对 iPSC 神经分化的作用

Mitne-Neto 等^[9]应用骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 信号通路的抑制剂 dorsomorphin 可以有效地促进人 iPSC 向运动神经元分化。Kim 等^[26]加用 Dkk1,一种 Wnt 信号通路的抑制剂,显著促进了人 iPSC 向玫瑰花环样结构的分化。Chambers 等^[27]的研究显示,Smad 信号通路的两种抑制剂 noggin 和 SB431542 能够明显提高人 iPSC 神经分化的效率。同样,物理刺激也对 iPSC 神经分化起调节作用。Koehler 等^[28]的研究证实,传代次数大于 20 次的小鼠 iPSC 较传代次数少于 10 次的 iPSC 能形成更大的 EB、具备更强的兴奋性、表达神经分化标志物的时间亦更早,因而增加传代次数有利于神经分化。Yamada 等^[29]发现,适度的电流刺激可以明显提高 EB 向各种类型神经细胞分化的效率,并能够缩短分化时间,他们认为,促进钙离子的内流可能是此现象的机制之一。在使用细胞因子或信号通路调节剂的同时亦可加用物理刺激以实现分化效率的提高。

5 其他可促进 iPSC 神经分化的方法

目前一些学者通过参考其他研究结果,采用类似的方法将 iPSC 诱导成为功能性神经细胞。Nakayama 等^[29]报道了“神经干细胞球分化法” (neural stem sphere method, NSS method),经三个阶段,最终将 ESC 转化为神经元。Hayashi 等^[30]借鉴此方式,成功地将鼠类 iPSC 转化为 NSS,并置于基质胶包被的培养板中进一步培养,NSS 随后形成球状的 NSC 集落,最后利用定向分化培养基使其成为各种成熟的神经细胞。Vierbuchen 等^[31]利用 Ascl1、Myt1l 和 Brn2 三种转录因子的组合,绕过多能干细胞阶段,首次将小鼠的成纤维细胞直接转变为功能性神经细胞。Pang 等^[32]据此验证了同样的三种因子可以促进人类 iPSC 的神经分化,他们使用强力霉素诱导的慢病毒载体结合增强型绿色荧光蛋白病毒将上述三种因子转移至未分化的 iPSC 中,并置于 N3 培养液中数天,细胞即表达成熟神经细胞的标志物 Tuj1 和微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2),并可以从原来的 iPSC 集落中迁移出来。他们也观察到单独应用 Ascl1 即可产生 MAP2 阳性细胞,而添加另外两种因子 (Myt1l、Brn2) 虽不能提高神经分化

效率,但可以促进形态学上的成熟。

6 在促进 iPSC 神经分化中有待明确的一些问题

目前一些信号通路调节剂、转录因子和转化方法对其他种类干细胞的神分化或体细胞直接重编程为神经细胞起调控作用,但对 iPSC 神经分化起何种作用尚不明确,需进一步研究。Li 等^[33]使用 SHH 激动剂 purmorphamine 可将人类 ESC 诱导分化为表达 Mn_x-1 的运动神经元。Serre 等^[34]明确了碱性螺旋环螺旋(basic helix-loop-helix)转录因子超表达对人类神经细胞生成的作用:Mash1 可以维持祖细胞的增殖状态,同时促进其向神经元和少突胶质细胞分化;而 Ngn2 不仅较 Ngn3 和 Mash1 可以更强烈地促进 γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA)能神经元、胆碱能神经元及运动神经元的产生,还可诱导星形胶质细胞的形成;但 Ngn3 和 Ngn1 对于神经胶质细胞的诱导无明显作用。Pang 等^[32]发现一种碱性螺旋环螺旋转录因子——Neuro D1, 它可与上述转录因子起协同作用,能将人类 Tuj1 阳性神经细胞的产出效率提高 2~3 倍。Son 等^[35]发现, Hb9 因子单独应用并没有提高人和小鼠成纤维细胞直接转变为运动神经元的效率,但与其他因子协同使用却有提高运动神经元生成效率的作用。但上述信号通路调节剂和转录因子目前并未被应用在 iPSC 神经分化过程中,它们对其有无影响、存在何种影响需进一步深入研究并加以明确。Gong 等^[16]描述了将小鼠 ESC 转变为 Pax6 阳性放射状胶质细胞的方法,且这种细胞可继续分化成同质性的神经元集落,并形成突触联系,但 iPSC 可否同样被诱导成放射状胶质细胞从而进一步分化为成熟的神经细胞有待研究。

7 存在的问题及前景展望

现阶段,在 iPSC 研究领域中需要克服的缺陷仍有很多,如提高重编程效率及安全性,降低操作复杂性,简化前体细胞的来源途径等,而找到一种能够高效、稳定的定向分化方法也是其中的难点之一^[36,37]。据报道^[30],在人 iPSC 定向分化中,只有约 20%的分化细胞是目的细胞,而剩下约 80%的细胞不能明确其类型。这种含有大量杂质细胞的细胞移植效果将难以保证。除此之外,仍有多种因素影响 iPSC 源性细胞移植后的疗效,如移植时间,细胞数量,细胞来源,培养环境及分化阶段等^[38],值得深入探索研究。目前,正因为对细胞移植后功能恢复的具体机制认识不清,因而移植效果欠佳,如 Jensen 等^[24]将人类 iPSC 源性 NSC 移植入卒中大鼠模型后发现其并没有减少坏死脑组织的体积,也没有促进其功能的恢复。

iPSC 作为再生医学中一个新成员,它的相关理念与技术在不到 6 年的时间里得到了极为迅猛的发展,其应用前景也越来越广阔。今后将会更深入研究 iPSC 定向分化的具体机制、调控要点、影响因素等,简化筛选、分离流程,明确功能恢复机制、优化细胞移植条件,使得 iPSC 真正成为

为再生医学中的理想工具。

8 参考文献

1. 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.
2. Koehler KR, Tropel P, Theile JW, et al. Extended passaging increases the efficiency of neural differentiation from induced pluripotent stem cells[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 82.
3. Pasca SP, Portmann T, Voineagu I, et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome[J]. *Nat Med*, 2011, 17(12): 1657-1662.
4. Denham M, Dottori M. Neural differentiation of induced pluripotent stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 793: 99-110.
5. Baharvand H, Mehrjardi NZ, Hatami M, et al. Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition[J]. *Int J Dev Biol*, 2007, 51(5): 371-378.
6. Bibel M, Richter J, Lacroix E, et al. Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1034-1043.
7. Bibel M, Richter J, Schrenk K, et al. Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(9): 1003-1009.
8. Marchetto MC, Carroumeu C, Acab A, et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2010, 143(4): 527-539.
9. Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, et al. Down-regulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(18): 3642-3652.
10. Hu BY, Weick JP, Yu J, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9): 4335-4340.
11. Farra N, Zhang WB, Pasceri P, et al. Rett syndrome induced pluripotent stem cell-derived neurons reveal novel neurophysiological alterations[J]. *Mol Psychiatry*, 2012, 17(12): 1261-1271.
12. Yao XL, Liu Q, Ye CH, et al. Neuronal differentiation potential of mouse induced pluripotent stem cells[J]. *Neuroreport*, 2011, 22(14): 689-695.
13. Uchida K, Okano H, Hayashi T, et al. Grafted swine neuroepithelial stem cells can form myelinated axons and both efferent and afferent synapses with xenogeneic rat neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 72(6): 661-669.
14. Falk A, Koch P, Kesavan J, et al. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons [J].

- PLoS One, 2012, 7(1): e29597.
15. Liu H, Zhang SC. Specification of neuronal and glial subtypes from human pluripotent stem cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(24): 3995–4008.
 16. Gong M, Bi Y, Jiang W, et al. Retinoic acid receptor beta mediates all-trans retinoic acid facilitation of mesenchymal stem cells neuronal differentiation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(4): 866–875.
 17. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(10): 755–765.
 18. Nizzardo M, Simone C, Falcone M, et al. Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(22): 3837–3847.
 19. Hester ME, Murtha MJ, Song S, et al. Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes[J]. *Mol Ther*, 2011, 19(10): 1905–1912.
 20. Patani R, Hollins AJ, Wishart TM, et al. Retinoid-independent motor neurogenesis from human embryonic stem cells reveals a medial columnar ground state [J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 214.
 21. Hu BY, Zhang SC. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(9): 1295–1304.
 22. Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(4): 806–811.
 23. Wada T, Honda M, Minami I, et al. Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells[J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6722.
 24. Jensen MB, Yan H, Krishnaney-Davison R, et al. Survival and differentiation of transplanted neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells in a rat stroke model[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2013, 22(4): 304–308.
 25. Martinez Y, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Generation and applications of human pluripotent stem cells induced into neural lineages and neural tissues[J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 1–9.
 26. Kim JE, O'Sullivan ML, Sanchez CA, et al. Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(7): 3005–3010.
 27. Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3): 275–280.
 28. Yamada M, Tanemura K, Okada S, et al. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 562–570.
 29. Nakayama T, Inoue N. Neural stem sphere method: induction of neural stem cells and neurons by astrocyte-derived factors in embryonic stem cells in vitro[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 330: 1–13.
 30. Hayashi K, Hashimoto M, Koda M, et al. Increase of sensitivity to mechanical stimulus after transplantation of murine induced pluripotent stem cell-derived astrocytes in a rat spinal cord injury model[J]. *J Neurosurg Spine*, 2011, 15(6): 582–593.
 31. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1035–1041.
 32. Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors [J]. *Nature*, 2011, 476(7359): 220–223.
 33. Li XJ, Hu BY, Jones SA, et al. Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 886–893.
 34. Serre A, Snyder EY, Mallet J, et al. Overexpression of basic helix-loop-helix transcription factors enhances neuronal differentiation of fetal human neural progenitor cells in various ways[J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(4): 539–553.
 35. 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.
 36. Masip M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC, et al. Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation[J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(11): 856–868.
 37. Chun YS, Byun K, Lee B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives[J]. *Anat Cell Biol*, 2011, 44(4): 245–255.
 38. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke Participants. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke(STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke [J]. *Stroke*, 2009, 40(2): 510–515.
- (收稿日期:2012-05-10 末次修回日期:2012-10-24)
(本文编辑 李伟霞)