

综述

诱导多能干细胞及其移植治疗脊髓损伤的研究进展

Research of induced pluripotent stem cells and their transplantation for repairing of spinal cord injury

唐超, 钟德君

(西南医科大学附属医院脊柱外科 646000 四川省泸州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.04.12

中图分类号: R683.2, Q254 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2017)-04-0368-04

目前临床上对脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 的治疗方法主要包括手术减压、神经营养药物治疗及康复功能锻炼, 但疗效并不理想, 常留有不同程度的神经功能永久缺失, 致残率高。外伤性 SCI 除直接导致脊髓神经细胞破坏外, 还会随着损伤时间的推移, 出现继发性损伤, 使病灶周围原来完整的组织发生自身破坏性病变, 表现为自由基生成增多, 兴奋性氨基酸过度释放以及炎症反应等^[1]。损伤后的免疫反应、囊肿和瘢痕形成, 少突胶质细胞和髓磷脂的丢失, 使得远端的神经纤维发生 Wallerian's 变性, 轴突稳定性和功能降低, 并造成广泛的组织破坏^[2]。随着再生医学干细胞技术的发展, 为 SCI 的治疗提出了新的方向。干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞, 可通过不断增殖以维持自身数目恒定。目前用于实验性 SCI 细胞移植的干细胞主要有间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)、少突胶质前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs)、胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 等, MSCs 为一种纤维状的黏连细胞, 具有多向分化潜能、造血支持、免疫调控和自我复制等特性^[3]。干细胞移植旨在针对 SCI 的病理机制, 替代丢失的内源性神经元或胶质细胞; 通过掩盖或中和抑制分子来提供有利于轴突生长的环境, 增强神经元自身再生能力。传统的胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 移植缺乏足够的供体来源并涉及伦理问题和免疫排斥。诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 是由分化的体细胞经过一定的基因改造而成的多能干细胞, 兼具干细胞的多种优点, 有着近似 ESCs 的自我更新能力和分化潜能^[4], 避免了免疫排斥反应及伦理问题。iPSCs 作为一种可直接从组织中获取并应用于自体移植的来源细胞, 目前已成为国内外干细胞领域研究的热点^[5]。在细胞替代性治疗及其机制研究、药物研究方面具有巨大的潜在价值。笔者拟对 iPSCs 移植治疗 SCI 的研究现状以及面临的困境进行综述。

第一作者简介: 男 (1991-), 在读研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤
电话: (0830)3165441 E-mail: 510895924@qq.com
通讯作者: 钟德君 E-mail: zdj-1974@163.com

1 iPSCs 的来源和生物学特性

1.1 iPSCs 的来源

iPSCs 是直接通过重编程技术控制特定的转录因子来表达细胞分化发展而来的^[6]。2007 年, 有学者报道利用慢病毒为载体, 通过转染 Oct4、Sox2、Nanog 及 Lin28 4 个基因, 将人成纤维母细胞重编程为 iPSCs^[7]。2009 年, Kim 等^[8]报道, 直接导入诱导重编程基因 Oct 就可以成功诱导出 iPSCs。由于诱导过程中不用插入编码 DNA 序列, 这也使得 iPSCs 的安全性进一步得到提高, 为 iPSCs 的临床研究和应用打好了基础。iPSCs 可通过自体获得, 避免产生免疫反应^[9], 可在治疗的最佳时机从所有成熟组织中制备得到。因产生的基因与受体组织完全相同, 移植后可完全融入到受体的基因组中^[10]。iPSCs 的移植过程不需要早期胚胎和生殖细胞的参与, 所以不涉及伦理道德的争议。尽管目前已有多种方法获取 iPSCs, 如病毒转导、质粒转染、游离型载体、易位系统、重组蛋白、化学方法、RNA, 但目前诱导效率仍较低^[6]。

1.2 iPSCs 的生物学特性

2006 年 Takahashi 等^[11]的研究团队首次将小鼠成纤维细胞诱导成一种与 ESCs 性质相似的干细胞, 被称为 iPSCs。iPSCs 与其他多能干细胞高度相似, 如基因表达、表面抗原、细胞形态、自我更新能力、表观遗传状态及端粒酶活性等特性, 且可向任一胚层的细胞类型分化。因此, iPSCs 和 ESCs 一样具有自我更新特性、多能性, 并应用于体外疾病模型、药物筛选以及细胞替代疗法^[12]。目前, 不仅已通过 iPSCs 获得了胰岛细胞^[13]、肝细胞^[14]等多种体细胞, 且可以直接分化产生成体小鼠, 充分证明 iPSCs 具有与 ESCs 几乎一样的全能性 (图 1)^[15]。相比于其他干细胞, (1) iPSCs 可直接来源于自体细胞, 解决了来源问题, 可在治疗的最佳时机从所有成熟组织中制备得到; (2) iPSCs 通过自体获得, 避免产生免疫反应; (3) iPSCs 的移植过程不需要早期胚胎和生殖细胞的参与, 所以不涉及伦理道德的争议。由于 iPSCs 兼具传统干细胞的多种优点, 且兼备其他干细胞不具备的多种优势, 通过其移植治疗 SCI 已成为再生医学研究的新希望。

2 iPSCs 移植治疗脊髓损伤的修复机制

2.1 iPSCs 的分化促进神经元的再生

由人 iPSCs 衍生出的神经球(hiPSC-NSs)植入受损的脊髓后,可在该处存活、迁移,并向神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞转化。由 hiPSC-NSs 分化的神经元可以和与宿主神经元之间建立功能性突触连接,增加神经生长因子的表达,促进损伤区域血管再生和形成髓鞘及神经前体细胞^[16]。研究发现,hiPSC-NSs 在植入受体脊髓后 56d,约 50%分化为各种神经元,且其中有一半为成熟神经元,包括大部分的 γ -氨基丁酸能神经元及少量胆碱能神经元; iPSCs 移植后可通过分化为成熟的少突胶质细胞来包绕轴突,形成正常的髓鞘结构而促进神经元的修复^[17]。hiPSC-NSs 产生的少突胶质细胞可促进宿主 5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)阳性神经元的再生^[18];而 5-HT 能神经元是中缝核下达脊髓胶质区、侧角和前角神经通路的组成部分,它的激活对小鼠后肢运动功能的恢复至关重要^[19],且 hiPSC 衍生的神经样干细胞分化的神经元可向脊髓灰质和白质延伸,进而促进后肢的结构和运动功能的恢复(图 2)。Nori 等^[20]经免疫电子显微技术观察突触前结构发现 hiPSC-NSs 衍生神经元与受体之间建立了突触连接。2015 年 Li 等^[21]对小鼠进行 C4 脊髓损伤造模导致膈神经损伤出现呼吸功能障碍,造模成功后于损伤平面脊髓腹侧角内移植 hiPSC-NSs,移植后 2d、2 周和 4 周检测,移植的 iPSCs 存活并分化为星形胶质细胞(GFAP 阳性),没有显示任何致瘤性,并有不少于 10%的增殖(Ki67 染色)。

2.2 iPSCs 的分化促进脊髓微环境的改善

SCI 后由于脊髓微环境的破坏,急性期释放大量的氧自由基和兴奋性氨基酸,此外还包括炎症因子、轴突生长抑制因子等,导致自身神经元大量坏死凋亡^[22]。iPSCs 植入后可通过促进神经生长因子、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达而改善损伤脊髓的微环境,从而间接增加自身神经元的存活数量,促进远端脊髓轴突的再生^[23]。其中 VEGF 是内皮细胞的有丝分裂原

和促血管生成因子。SCI 后会造成局部缺血及缺氧^[24],而星形胶质细胞中的 VEGF 可在缺氧条件下表达。hiPSC 植入受损脊髓后,通过向星形胶质细胞分化使得 VEGF 高表达,进而增加损伤部位的血管数量^[25],促进组织的自身修复。其次,iPSCs 移植后衍生细胞(iPSC-derived cells)可分泌出细胞因子和趋化因子,这些因子可以帮助脊髓神经再生重塑,对脊髓微环境中影响脊髓恢复的炎症因子等具有抑制作用^[26]。

3 iPSCs 移植治疗 SCI 的动物实验研究现状

2006 年 Takahashi 等^[11]首次成功将小鼠成纤维细胞诱导出与 ESC 相似分化细胞以来,iPSCs 在动物 SCI 修复的研究与日益增多。有研究表明^[27],通过促使 Sox10、Olig2 和 Zlf536 基因的表达可直接从小鼠胚胎成纤维细胞重编程为少突胶质细胞的前体细胞,该神经前体细胞可以在体外或体内形成髓鞘的脊髓背根神经节细胞,恢复小鼠运动功能障碍。Tsji 等^[28]将人源 iPSCs 分化产生的神经上皮样细胞移植到联合免疫缺陷小鼠受损的脊髓中,细胞存活并且分化为神经细胞,促进了小鼠后肢的功能恢复。该结果表明 iPSCs 移植可以提高甚至恢复脊髓损伤小鼠的功能。Oh 等^[29]利用人类椎间盘的终板细胞成功重编程为 iPSCs,该细胞具有胚胎干细胞的功能,通过移植到脊髓损伤的小鼠体内,可以定向分化为具有动作电位的神经细胞,有效改善和防止小鼠的脊髓萎缩。目前,大量的临床前期研究以及体外和体内的疾病模型建立,已经使 iPSCs 技术得到快速的发展。尽管还是动物实验研究的技术,但其中一些已经获取或正在进行的试验评价疗效和安全性研究给研究者带来了希望,如阿尔兹海默症、肌萎缩性侧索硬化症、角膜内皮功能障碍、Stevens Johnson 综合征、心力衰竭、视网膜色素变性、难治性血小板减少症^[30]。相比之下,颈脊髓损伤的临床前和临床干细胞移植的研究相当缺乏,目前进行临床研究 iPSC 移植治疗颈脊髓损伤比较少。

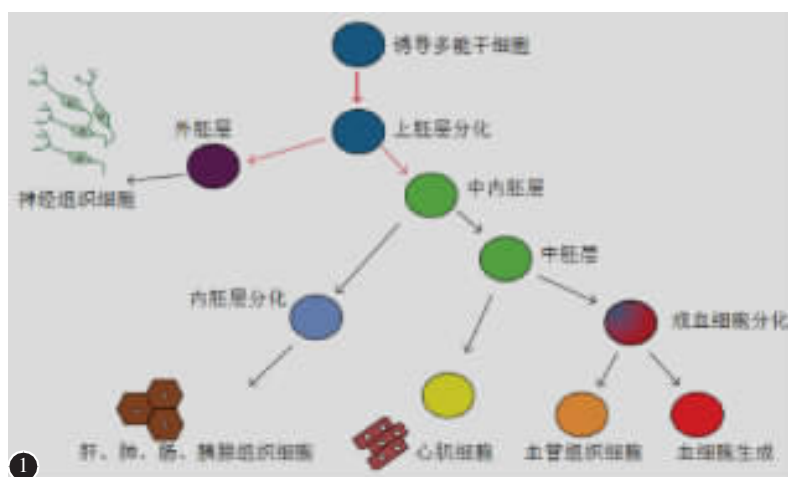


图 1 人类诱导多能干细胞具有分化的多能性及全能性 图 2 iPSCs 应用于脊髓损伤的治疗过程

4 iPSCs 移植治疗 SCI 研究面临的困境及前景

iPSCs 作为一种理想的脊髓损伤修复来源细胞,给未来应用于临床治疗 SCI 带来了希望。然而,在未来 SCI 的临床治疗中为了促进 iPSCs 的应用,仍有一些问题需要解决:①获取 iPSCs 的效率。尽管获取的 iPSCs 的数量和质量不同,到目前为止获取 iPSCs 的效率仍较低 (0.001%~10%)^[31]。iPSCs 起源于已分化的组织细胞,从逆转录病毒转染重编程到 iPSCs 整合到特定部位的各步骤需要经历复杂的长潜伏期^[32];所以,从目前的研究技术水平想要在较短的治疗周期,通过体细胞重编程获取 iPSCs,并保证 iPSCs 移植后成功分化为功能神经元还存在较大困难。②iPSCs 来源的选择。不同组织来源重编程的 iPSCs 的固有分化特性不同,因此导致 iPSCs 移植到受体后的免疫原性也呈现一定差异^[33],这些可能成为治疗成败的决定性因素。③iPSCs 的免疫反应及安全性。目前的研究大多通过使用逆转录病毒和慢病毒作为转载体获取 iPSCs,重编程过程可能改变内源基因的表达从而增加引发肿瘤的风险;近年来已有研究者通过瞬时基因表达的方法避免使用转载体^[34],但仍需严格控制转入基因浓度。

除此之外,最近, Saadai 等^[35]将 iPSCs 衍生出的神经球(hiPSCs-NSs)在体外分化为神经嵴干细胞后植入脊髓脊膜膨出胚胎羊模型,发现能成功融入损伤脊髓并向神经系分化,且这一过程没有肿瘤发生。然而, Nutt 等^[36]将 hiPSCs 在体外分化为具有区域特异性的神经前体细胞后植入 SCI 大鼠模型,发现其产生的神经元和胶质细胞未能有效促进运动和感觉功能的恢复。以上研究提示 hiPSCs 具有高效修复 SCI 的潜力,同时安全性更高。但需正确把握 iPSCs 衍生的前体细胞的移植时间窗,这也为 iPSCs 移植后定向分化的研究提供了思路 and 方向。

5 小结和展望

综上所述,iPSCs 所具有的生物学特性可以回避许多传统干细胞移植治疗所存在的问题,让我们看到脊髓再生研究具有广阔的前景。但是,从 iPSCs 的获得到植入受体组织,定向分化为功能神经元的每一个环节,都存在未能解决的问题和潜在的风险^[37],目前对于重编程获取 iPSCs 效率问题,国内外从信号通路及基因层面进行了大量研究,也取得了一定的进展。对于 iPSCs 移植后定向分化的研究困难重重,需要处理定向分化效率及分化安全性等方面的问题。目前有研究表明,iPSCs 衍生出的神经球(hiPSCs-NSs)在体外分化为特定的神经干细胞后移植到 SCI 大鼠模型,可以获得满意的定向分化效果,且安全性更高。

6 参考文献

- Bareyre FM, Schwab ME. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord insights from DNA microarrays[J]. Trends Neurosci, 2003, 26(10): 555-563.

- Pohl HB, Porcheri C, Mueggler T, et al. Genetically induced adult oligodendrocyte cell death is associated with poor myelin clearance, reduced remyelination and axonal damage [J]. J Neurosci, 2011, 31(3): 1069-1080.
- Boido M, Garbossa D, Fontanella M, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome following spinal cord compression [J]. World Neurosurg, 2014, 81(1): 183-190.
- Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells [J]. Cell Res, 2013, 23(1): 71-80.
- Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells[J]. Neurotherapeutics, 2011, 8(4): 668-676.
- Tang HL, Sha HY, Sun HP, et al. Tracking induced pluripotent stem cells - derived neural stem cells in the central nervous system of rats and monkeys, cellular reprogramming [J]. Cell Reprogram, 2013, 15(5): 435-442.
- 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.
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. Cell, 2009, 136(3): 411-419.
- Pearl JI, Lee AS, Leveson-Gower DB, et al. Short-term immunosuppression promotes engraftment of embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(3): 309-317.
- Han SSW, Williams LA, Eggan KC. Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease[J]. Neuron, 2011, 70(4): 626-644.
- 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.
- Jung YW, Hysolli E, Kim KY, et al. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies[J]. Curr Opin Neurol, 2012, 25(2): 125-130.
- Zhang D, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells [J]. Cell Res, 2009, 19(4): 429-438.
- Song ZH, Cai J, Liu YX, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells [J]. Cell Res, 2009, 19(11): 1233-1242.
- Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. Nature, 2009, 461(7260): 86-90.
- Zhang S, Gu B. Induced pluripotent stem cells and their transplantation for spinal cord injury: current status[J]. Acta Neuropharmacologic, 2013, 3(3): 57-61.
- Nakamura M, Tsuji O, Nori S, et al. Cell transplantation for spinal cord injury focusing on iPSCs [J]. Expert Opin Biol

- Ther, 2012, 12(7): 811–821.
18. 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 USA*, 2010, 107(28): 12704–12709.
19. Hayashi Y, Jacob-Vadakot S, Dugan EA, et al. 5-HT precursor-loading, but not 5-HT receptor agonists, increases motor function after spinal cord contusion in adult rats [J]. *Exp Neurol*, 2010, 221(1): 68–78.
20. Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al. Grafted human induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(40): 16825–16830.
21. Li K, Javed E, Scura D, et al. Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury [J]. *Exp. Neurol*, 2015, 271: 479–492.
22. Bareyre FM, Schwab ME. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays [J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(10): 555–563.
23. Brock JK, Rosenzweig ES, Blesch A, et al. Local and remote growth factor effects after primate spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(29): 9728–9737.
24. Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, et al. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 93–99.
25. Qin J, Gong GM, Sun SL, et al. Functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat hemorrhagic stroke model [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 554: 70–75.
26. Khazaei M, Siddiqui AM, Fehlings MG, et al. The potential for iPS derived stem cells as a therapeutic strategy for spinal cord injury: opportunities and challenges [J]. *J Clin Med*, 2014, 294(1): 37–65.
27. Doulaumes VM, Plant GW. Plant, induced pluripotent stem cell therapies for cervical spinal cord injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 530.
28. Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells [J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 668–676.
29. Oh J, Lee KI, Kim HT, et al. Human-induced pluripotent stem cells generated from intervertebral disc cells improve neurologic functions in spinal cord injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 25.
30. Okano H, Yamanaka S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease [J]. *Mol Brain*, 2014, 7: 22.
31. 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.
32. Yagi T, Ito D, Okada Y, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4530–4539.
33. Fu XM. The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Mol Immunol*, 2014, 11(1): 14–16.
34. Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 771–775.
35. Saadai P, Wang AJ, Nout Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived neural crest stem cells integrate into the injured spinal cord in the fetal lamb model of myelomeningocele [J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(1): 158–163.
36. Nutt SE, Chang EA, Suhr ST, et al. Caudalized human iP-SC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model [J]. *Exp Neurol*, 2013, 248: 491–503.
37. Fung RK, Kerridge IH. Uncertain translation, uncertain benefit and uncertain risk: ethical challenges facing first-in-human trials of induced pluripotent stem (IPS) cells [J]. *Bioethics*, 2013, 27(2): 89–96.
- (收稿日期: 2016-12-28 末次修回日期: 2017-02-03)
(本文编辑 卢庆霞)