

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0729

细胞基因重编程在中枢神经损伤修复中的应用

孙 秀,袁一旻,胡 昕,秦尚尧,苏志达*

第二军医大学神经科学研究所,分子神经生物学教育部重点实验室,上海 200433

[摘要] 神经干细胞移植替代治疗已经成为治疗中枢神经损伤的一个重要手段,但其细胞来源由于伦理学和免疫排斥等问题而受到了限制。既往研究认为,非神经细胞不能转变成神经细胞。但诱导型多潜能干细胞出现之后,研究发现,通过细胞基因重编程技术可以将鼠和人的自身体细胞诱导转分化为神经干细胞或各种类型的神经元,从而避免了细胞移植治疗中相关的伦理学问题和免疫排斥反应,表明细胞基因重编程在中枢神经损伤修复中具有很好的应用前景。本文对细胞基因重编程技术在诱导神经干细胞或神经元形成方面的相关研究进展及其在中枢神经损伤修复中的应用进行了综述。

[关键词] 中枢神经系统;重编程;神经退行性疾病;神经损伤;细胞移植

[中图分类号] R 338.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)06-0729-09

Application of cell lineage reprogramming for central nervous system injury and repair

SUN Xiu, YUAN Yi-min, HU Xin, QIN Shang-yao, SU Zhi-da*

Institute of Neuroscience, Key Laboratory of Molecular Neurobiology of Ministry of Education, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Transplantation of neural stem cells (NSCs) has become an important therapeutic strategy for central nervous system (CNS) injury; however, the potential immune rejection and ethical concerns limit the transplantation-based cell therapy in clinic. Alternatively, induced pluripotent stem cells (iPSCs) may overcome these major hurdles and cast new lights on cell therapy. Recent studies have shown that a variety of somatic cells from mouse or human can be reprogrammed into NSCs or neurons, suggesting that reprogramming of cell fate may represent a promising strategy for CNS repair. Here, we reviewed the current knowledge of cell lineage reprogramming, reprogramming-mediated induction of NSCs or neurons and their application in CNS repair.

[Key words] central nervous system; reprogramming; neurodegenerative disease; neurotrauma; cell transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 729-737]

众所周知,和皮肤、骨骼等其他组织不同,成熟的中枢神经系统再生能力非常有限。帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、脑外伤、脊髓损伤、脑卒中等中枢神经系统病变或创伤往往会引起不可逆性神经元变性缺失,从而导致严重的神经症状,甚至出现不同程度的瘫痪。目前,中枢神经系统病变或创伤还没有有效的治疗方法,且预后多不佳。因此,探索一种能够有效促进中枢神经系统损伤修复的策略已成为该领域研究者关注的焦点。近年来,神经干细胞移植替代治疗被认为是促进神经损伤修复的一种重要手段,利用具有神经细胞分化能

力的神经干细胞移植能够有效促进大鼠和其他哺乳动物模型的中枢神经损伤修复。然而,在临床上应用新生儿脑组织或者胚胎干细胞来源的神经干细胞移植来修复神经损伤,却因为细胞免疫排斥反应以及伦理问题而受到限制。诱导型多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)的出现将有可能克服这些困难^[1]。iPSC是由自身体细胞经过基因重编程诱导分化而来,经过特殊培养可将其进一步诱导分化成神经干细胞或不同类型的神经元,从而应用于中枢神经损伤修复。本文主要介绍细胞基因重编程技术在诱导神经干细胞或神经元形成方面的相

[收稿日期] 2015-11-13 **[接受日期]** 2016-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金(81271352),上海市科技创新行动计划(15JC1400202),上海市浦江人才计划(15PJ1410500)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81271352), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (15JC1400202), and Shanghai Pujiang Talent Program (15PJ1410500).

[作者简介] 孙 秀,硕士生。E-mail: xiusun1992@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871042-506, E-mail: suzhida@smmu.edu.cn

关研究进展及其在中枢神经损伤修复中的应用前景。

1 神经干细胞以及成年神经再生的发现

既往医学研究认为中枢神经系统的神经元是一类不可再生细胞,出生前或者出生后不久就丧失了再生能力,因此认为中枢神经系统病变或损伤造成的神经元变性缺失也是不可逆转的。然而,1962年 Altman 和 Das^[2-3]的研究发现,在成年大鼠脑内注射³H 标记的胸腺嘧啶核苷后,当大脑受到创伤时可以从观察到许多被³H 标记的胶质细胞、神经元以及神经干细胞,这些细胞可能是脑内新生的神经细胞。此后相关研究进一步证实成年啮齿类和灵长类动物海马及嗅球等部位可产生新的神经元,而且这种神经再生现象持续于整个成年期^[4-5]。1998年, Gould 等^[4]研究证实成年猴齿状回部位的神经元可以再生,且再生的神经元数量受到应激反应的影响。同年, Eriksson 等^[5]也发现人类海马齿状回能产生新的神经元,并进一步证明该神经元再生现象贯穿于整个生命过程中。既然神经元能够在体内再生,那么这些新生的神经元是如何产生的呢? 1992年 Reynolds 和 Weiss^[6]从成年哺乳动物脑内纹状体中分离出一种能在体外不断分裂增殖的细胞,该细胞具有多种分化潜能,能够分化成神经元和星形胶质细胞。他们将这种具有多潜能分化能力的细胞称为神经干细胞,从而正式提出了神经干细胞的概念,也打破了神经细胞不能再生的这一传统观念。Mckay^[7]于1997年正式将神经干细胞定义为具有分化为神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞的能力,能够自我更新并提供大量脑组织细胞的一类细胞。

人类神经干细胞的来源主要有3种:(1)通过内细胞团得到胚胎干细胞,进而诱导分化得到神经干细胞。这种方式得到的神经干细胞分化潜能大、具有较强的自我更新和多潜能分化能力,但在临床应用上存在来源有限和伦理学问题;(2)从流产的胎儿中获取神经组织,从中分离得到胎儿神经干细胞。这种方式获得的神经干细胞数量多,但是存在伦理学、来源受限、有些胎儿具有组织遗传缺陷等问题;(3)经过知情同意,从已死亡的人的大脑组织中获取成年神经干细胞。这种方式虽然没有伦理学问题,但是得到的神经干细胞常有脑区特异性,且分化能力有限。上述分离培养得到的神经干细胞在临床上可以用于移植治疗帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、脑外伤、脊髓损伤、脑卒中等中枢神经系统病变或创伤,也可以用于药物筛选及肿瘤治疗。Kim 等^[8]利用小鼠胚胎干细胞体外诱导分化获

得多巴胺能神经元,这些神经元移植到帕金森病动物模型脑内后能存活并促进神经损伤修复。但上述方法在临床应用上还存在很多问题,比如细胞来源的伦理问题、免疫排斥反应和移植后成瘤风险等,近年来 iPSC 技术的出现有可能解决上述问题。

2 iPSC 技术

iPSC 是一类由体细胞经过基因重编程转分化形成的多潜能干细胞,它们具有和胚胎干细胞类似的功能,能够进一步诱导分化成包括神经干细胞在内的机体所有组成细胞。iPSC 突破了初始细胞来源的年龄限制,在中枢神经退行性疾病和神经损伤治疗方面有巨大的应用前景。通过 iPSC 技术,我们将可以从患者自身取材获取皮肤成纤维细胞等体细胞,将其诱导转分化成多潜能干细胞,进而再诱导分化获得神经干细胞;我们也可以将上述体细胞直接诱导转分化为神经干细胞,避开伦理学问题和免疫排斥反应等障碍。2012年 Han 等^[9]首次直接将成纤维细胞成功诱导转分化为神经干细胞,正式开启了 iPSC 技术在神经损伤修复中的应用研究。

虽然 iPSC 技术在神经损伤修复中具有广泛的应用价值,但是该技术也存在一些问题。iPSC 技术的效率较低、耗时长,难以在短时间内获得移植治疗所需的细胞,易导致错过移植治疗的最佳时间窗。如在啮齿类动物模型中运用神经干细胞移植治疗脊髓损伤时,最佳的移植时间窗在损伤的亚急性期,即在损伤后 14 d 左右移植才能获得最佳的神经功能修复效果,但 iPSC 技术在啮齿类动物模型中需要 60 d;对于人类则耗时更久,所需时间为啮齿类动物模型的 2 倍^[10]。此外,神经干细胞移植到体内后必须能够分化成神经损伤修复所需的神经元才能保证其发挥修复作用;而移植神经干细胞后,其未分化的细胞有可能会形成畸胎瘤^[11]。因此,寻求建立耗时短、分化完全、安全性能高的细胞基因重编程策略已经成为神经科学界研究的一个重要突破口。

3 细胞基因重编程获得神经元的途径:间接和直接方式

细胞基因重编程获得神经元的间接方式是先将体细胞诱导转分化成多潜能干细胞或者神经干细胞,再进一步诱导分化为神经元。例如, Yuan 等^[12]将诱导形成的多潜能干细胞在体外利用四阶段培养方式诱导分化成神经干细胞; Han 等^[9]发现,在 Brn4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 种转录因子的基础上再加入 E47 能将成纤维细胞诱导转分化成神经干细

胞,传50代以上后可得到神经元。获得神经元的直接方式是利用基因重编程技术直接将成熟体细胞转分化成神经元,不需要经过多潜能干细胞或神经干细胞等中间步骤。通过基因重编程使一种体细胞直接转分化为另一种体细胞的概念是在1987年被第一次提出^[13],甚至早于iPSC的发现。Weintraub等^[14]利用转录分子MyoD将成纤维细胞直接转分化成肌原细胞;Ieda等^[15]利用Gata4、Mef2c和Tbx5这3种转录因子成功地将成纤维细胞直接重编程为心肌细胞。至2010年Vierbuchen等^[16]利用Brn2、Myt1l和Ascl1这3种转录因子成功将成纤维细胞转分化为神经元,即诱导型神经元(induced neurons, iNs),实现了利用重编程技术将体细胞直接转分化为神经元的设想。此后,研究人员相继通过基因重编程将成纤维细胞^[17]和星形胶质细胞^[18]直接转分化为特定类型的神经元。而进一步研究发现,体细胞也可以在体内直接被转分化为神经元^[19],目前已成功利用基因重编程在体内直接将星形胶质细胞转化为神经元^[20-21]。与间接方式比较,通过直接方式获得神经元避开了多潜能干细胞和神经干细胞等中间阶段,大大降低了细胞移植治疗时肿瘤形成的风险,在临床应用上具有较高的安全性。

4 细胞基因重编程的策略

4.1 利用转录因子进行细胞基因重编程 目前细

胞基因重编程的主要手段是利用转录因子,如Takahashi和Yamanaka^[1]利用Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4这4种转录因子将成纤维细胞转分化为iPSC。既往认为,在上述4种转录因子中,Sox2是不可或缺的。然而,Sheng等^[22]通过Pax6、Ngn2、Hes1、Id1、Ascl1、Brn2、c-Myc和Klf4这8种转录因子实现了支持细胞(来源于鼠胚胎生殖腺)向神经干细胞的转分化,改变了大众对Sox2作用的认识。此外,Heins等^[23]首次发现,利用单个转录因子Pax6就能将星形胶质细胞直接转分化成神经元。Heinrich等^[18, 24]研究表明,在星形胶质细胞中导入不同的转录因子能使其转分化为特定亚型的神经元,如导入Ngn2可获得谷氨酸能神经元,而导入Ascl1或Dlx2则可得到多巴胺神经元。Karow等^[25]利用Sox2和Ascl1这2个转录因子将周细胞诱导转分化成神经元。Yang等^[26]和Najm等^[27]研究发现,采用合适的转录因子组合(Sox10/Olig2/Zfp536或Sox10/Olig2/Nkx6.2)能够将成纤维细胞转分化成少突胶质细胞前体细胞。表1和表2总结了目前在神经领域内由转录因子介导的利用小鼠和人的不同体细胞进行细胞基因重编程的相关研究工作。近年来虽然利用转录因子进行细胞基因重编程取得了很大进展,但关于转录因子使体细胞转分化为其他细胞的机制目前仍不是很清楚,有待深入研究。

表1 转录因子介导的小鼠体细胞基因重编程

Tab 1 Transcription factor-mediated reprogramming of mouse somatic cells

Approach	Somatic cell	Induced cell	Transcription factor	Reference
<i>In vitro</i>	Fibroblast	Glutamatergic neuron	Ascl1, Brn2, Myt1l	[16]
	Astrocyte	GABAergic neuron	Ascl1, Dlx2	[18]
	Astrocyte	Glutamatergic neuron	Ngn2	[18]
	Fibroblast	Motor neuron	Ascl1, Myt1l, Lhx3, Hb9, Brn2, Isl1, Ngn2	[28]
	Fibroblast	Dopaminergic neuron	Ascl1, Lmx1a, Nurr1	[17]
	Fibroblast	Dopaminergic neuron	Ascl1, Pitx3, Lmx1a, Nurr1, Foxa2, EN1	[29]
	Hepatocyte	Neuron	Ascl1, Brn2, Myt1l	[30]
	Fibroblast	Neural progenitor cell	Brn2, Sox2, FoxG1	[31]
	Fibroblast	Neural stem cell	Brn4, Sox2, Klf4, c-Myc, E47	[9]
	Fibroblast	Neural stem cell	Sox2, Klf4, c-Myc, Oct4	[32]
	Fibroblast	Neural stem cell	Sox2	[33]
	Fibroblast	Dopaminergic neuron	Lmx1a, Foxa2, Ascl1, Brn2 or Lmx1b, Otx2, Nurr1, Ascl1, Brn2	[34]
	Supporting cell	Neural stem cell	Ascl1, Ngn2, Hes1, Id1, Pax6, Brn2, Sox2, c-Myc, Klf4	[22]
	Fibroblast	Neuron	Ascl1	[35]
	<i>In vivo</i>	Astrocyte	Neuroblast	Sox2
Astrocyte		Neuron	Ascl1, Brn2, Myt1l	[19]
Astrocyte		Glutamatergic neuron	NeuroD1	[20]
NG2 cell		Glutamatergic and dopaminergic neuron	NeuroD1	[20]
Astrocyte		Neural stem cell	Sox2	[36]

表 2 转录因子介导的体外人类体细胞基因重编程

Tab 2 Transcription factor-mediated *in vitro* reprogramming of human somatic cells

Somatic cell	Induced cell	Reprogramming factor	Reference
Fibroblast	Dopaminergic neuron	Ascl1, Brn 2, Myt1l, Lmx1a, Foxa2	[37]
Fibroblast	Dopaminergic neuron	Ascl1, Lmx1a, Nurr1	[17]
Fibroblast	Glutamatergic neuron	Ascl1, Brn 2, Myt1l, NeuroD1	[38]
Fibroblast	Glutamatergic neuron	Brn2, Myt1l, miR-124	[39]
Fibroblast	Glutamatergic neuron or GABAergic neuron	Ascl1, Myt1l, NeuroD2, miR-9/9*, miR-124	[40]
Fibroblast	Motor neuron	Brn2, Ascl1, Myt1l, Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2	[28]
Fibroblast	Neural stem cell	Sox2	[33]
Fibroblast	Neuron	Ascl1, Ngn2, CHIR99021, SB431542	[41]
Fibroblast	Dopaminergic neuron	Ascl1, Ngn2, Sox2, Nurr1, Pitx3	[42]
Fibroblast	Glutamatergic neuron	Ngn2, Forskolin, Dorsomorphin	[43]
Fibroblast	Neuron	Ascl1	[35]
Fibroblast	Neural crest stem cell	Sox10	[44]
Pericyte	Neuron	Sox2, Ascl1	[25]
Glioma cell	Neuron	Ngn2, Sox11	[45]

4.2 利用小分子化合物或 microRNA(miRNA)进行细胞基因重编程 移植治疗中枢神经系统损伤需要大量细胞,而现有转录因子介导的细胞基因重编程效率均较低,且导入外源性转录因子可能导致细胞基因突变和染色体改变,从而诱发肿瘤形成。为了克服上述缺点,各研究团队开始致力于寻找其他能有效介导细胞基因重编程的策略,比如采用非整合基因传递方法或可穿透细胞膜的蛋白质来诱导细胞基因重编程。通过小分子化合物和 miRNA 诱导细胞基因重编程的研究也取得了一定进展。

与基因操作相比,小分子化合物有很多独特的优势:(1)容易在体外合成,而且费用低;(2)分子小,容易透过细胞;(3)能根据浓度和(或)组合的不同发挥不同的作用效果。近年来的研究表明,小分子化合物不仅可以提高转录因子介导的细胞基因重编程效率,还可以替代一些转录因子诱导细胞基因重编程(表 3)。例如,研究发现在转录因子介导的细胞基因重编程体系中加入组蛋白脱乙酰基酶抑制剂丙戊酸(valproic acid, VPA)或 DNA 甲基化酶抑制剂 5-氮杂胞苷(5-aza-cytidine, AZA)均能够促进细胞基因重编程动力学,从而提高转分化效率^[46]。c-Myc是诱导 iPSC 的一种重要转录因子,但它又是一种癌基因,有诱发肿瘤形成的风险。Huangfu 等^[47]研究发现, VPA 能替代 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 中的 c-Myc 诱导成纤维细胞向多潜能干细胞转分化,并使转分化的效率提高 100 多倍。Kenpaullone 是一种糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)抑制剂,能够取代

Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 中的 Klf4 介导细胞基因重编程^[48]。转化生长因子 β(transforming growth factor-β, TGF-β)信号抑制剂 RepSox 能够替代 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 中的 Sox2,通过诱导转录因子 Nanog 介导细胞基因重编程^[49]。小分子化合物 BIX-01294 是一种 G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂,有研究表明它能够取代 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 中的 Sox2 和 c-Myc,而与 Oct4/Klf4 协同作用完成成纤维细胞向多潜能干细胞的转分化^[50-51]。此外,小分子化合物还能单独应用诱导细胞基因重编程。Hou 等^[52]在不加入转录因子的条件下,单独使用 6 种小分子化合物组合 VC6TFZ(VPA/CHIR99021/616452/Tranylcypromine/Forskolin/DZNep)成功将成纤维细胞诱导转分化为多潜能干细胞。Cheng 等^[53]单独使用 3 种小分子化合物组合 VCR(VPA/CHIR99021/Repsox)在低氧条件下实现了小鼠胚胎成纤维细胞向神经前体细胞的转分化。Li 等^[54]研究表明,小鼠成纤维细胞在 4 种小分子化合物组合 FICS(Forskolin/ISX9/CHIR99021/SB431542)的作用下可直接被转分化为神经元;同时 Hu 等^[55]报道,利用 7 种小分子化合物组合 VCRFSGY(VPA/CHIR99021/Repsox/Forskolin/SP600125/GO6983/Y-27632)可以诱导正常人或阿尔茨海默病患者来源的成纤维细胞直接转分化成神经元。综上所述,尽管小分子化合物是否能够完全替代基因转导目前还不能下定论,但其相对于转录因子独特的优势使其在未来中枢神经损伤修复临床应用中具有巨大的潜能。

表3 小分子化合物在细胞基因重编程中的应用

Tab 3 Application of small molecule compounds in the cell fate reprogramming

Small molecule	Function	Substituted transcription factor	Target cell	Effect on reprogramming	Reference
AZA	DNA methyltransferase inhibitor		Mouse fibroblast	Improves reprogramming efficiency by 3-10 folds	[47, 56]
VPA	Histone deacetylase inhibitor	c-Myc	Mouse fibroblast	Improves reprogramming efficiency by 50 folds	[47]
			Human fibroblast	Improves reprogramming efficiency by 10-20 folds	[57]
			Mouse fibroblast	Improves reprogramming efficiency by more than 100 folds	[47]
RepSox (E-616452)	Inhibition of TGF- β signaling pathway	Sox2	Mouse fibroblast	Combination with OKM can induce cell reprogramming, but the efficiency is low	[49]
BIX01294	G9a histone methyltransferase inhibitor	Sox2, c-Myc	Mouse fibroblast	Reprogramming efficiency is increased by 5 folds compared with OK (Oct4/Klf4)	[50]
			Mouse neural progenitor cell	Reprogramming efficiency is increased by 1.5 folds compared with OSKM (Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc) and by 8 folds compared with OK (Oct4/Klf4)	[51]
PD0325901+ CHIR99021	Inhibitors of MEK and GSK3, respectively	Oct4	Mouse neural progenitor cell	Can replace Oct4, but the reprogramming efficiency is low	
			Mouse neural stem cell	Combination with LIF can induce the ground state pluripotency	[58]
			Mouse neural progenitor cell	PD0325901 can promote the growth of iPSC and inhibit the growth of non-iPSC	[51]
Kenpaullone	GSK-3 β inhibitor	Klf4	Mouse fibroblast	Can replace Klf4, but the reprogramming efficiency is low	[48]
Tranilcypromine	Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) inhibitor		Mouse fibroblast	Induce the pluripotency program by blocking differentiation program	[52, 59]
Forskolin	Adenine nucleotide activator		Mouse fibroblast	Increase the expression of cAMP	[59]
DZNep	S-adenosine homocysteine (SAH) inhibitor		Mouse fibroblast	Combination with VPA, CHIR99021, 616452, tranilcypromine and Forskolin (VC6TFZ) can reprogram fibroblast into iPSC	[52, 59]

AZA: 5-Aza-cytidine; VPA: Valproic acid; iPSC: Induced pluripotent stem cell

MiRNA 是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA, 其长约 20~25 个核苷酸。近年来研究发现, miRNA 在细胞基因重编程中也扮演了重要的角色。与成体细胞相比, 人胚胎干细胞特异性表达一些 miRNA, 如 miR-302a、miR-302b、miR-302c、miR-302d、miR-367、miR-371、miR-372、miR-373 等, 它们被称为胚胎干细胞特异性 miRNA^[60]。miRNA 参与了外源性转录因子介导的细胞基因重编程过程, miR-17、miR-93、miR-106a、miR-106b、miR-302b 等在细胞基因重编程早期阶段会被诱导高表达, 而过表达或抑制 miRNA 均会影响细胞基因重编程的效率^[61-62]。例如在 Oct4/Sox2/Klf4/c-Myc 诱导 iPSC 体系中加入

miR-93 和 miR-106b 可明显地促进多潜能干细胞的产生^[62]。miRNA 调节细胞基因重编程有多种途径, 包括调控细胞增殖、细胞凋亡、染色体重塑、表皮间质转化等^[63]。研究表明, miRNA 在不存在外源性转录因子的条件下也能实现对体细胞的基因重编程^[60]。Wang 等^[64]利用 miR-200c、miR-302s 和 miR-369s 成功地将小鼠和人脂肪基质细胞诱导重编程为多潜能干细胞; Anokye-Danso 等^[65]研究显示, miR-302/367 能快速而高效地实现小鼠或人类成纤维细胞在没有外源性转录因子的条件下向多潜能干细胞转化的过程。尽管 miRNA 诱导细胞基因重编程的具体分子机制还不清楚, 但这为寻找能够应用于临床的细胞基因重编程策略提供了新的研究思路。

5 细胞基因重编程在中枢神经损伤修复中的应用

中枢神经损伤包括帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、脑外伤、脊髓损伤、脑卒中等中枢神经系统病变或创伤,其主要病理学特征是神经元不可逆性变性缺失。随着 iPSC 的出现,利用细胞基因重编程技术促进中枢神经损伤修复已经成为一个重要策略。通过细胞基因重编程将患者自身体细胞诱导分化为神经元,移植替代变性缺失的神经元,既能避开伦理学问题,又不会引起免疫排斥反应。目前,利用细胞基因重编程将患者自身体细胞转分化为神经元一般有 3 种途径:(1)先将体细胞诱导成多潜能干细胞,进而分化得到神经干细胞,最后再分化获得所需的神经元;(2)由体细胞直接诱导成神经干细胞,然后分化得到神经元;(3)直接将体细胞诱导转分化成神经元。上述通过细胞基因重编程所得的神经元可用作疾病体外细胞模型的病理研究、药物筛选及药理分析等;也可以将这些神经元移植到患者身上,促进神经损伤修复。帕金森病是由于中脑多巴胺神经元的退化导致的,移植多巴胺神经元能够改善症状。有研究报道,将人类诱导多潜能干细胞(hiPSCs)体外定向分化所得的多巴胺神经元,或由小鼠成纤维细胞直接转分化所得的多巴胺神经元移植到帕金森病小鼠脑内,可以明显减轻小鼠相关神经症状^[29, 66]。Oki 等^[67]研究表明,将 hiPSCs 体外定向分化所得的神经上皮样干细胞移植到脑卒中小鼠或大鼠的皮质和纹状体,1 周后动物的前爪运动功能得到明显改善。

虽然细胞基因重编程技术给中枢神经损伤修复带来了希望,但目前的技术水平应用于临床还面临转分化不完全、效率较低、耗时长等诸多困难。另外,中枢神经损伤移植治疗需要大量的细胞,注射时容易对患者造成二次创伤;而且外源性神经干细胞或神经元移植到体内后很难存活并分化为治疗所需的特定神经元。基于此研究者提出了直接在体内将体细胞转分化成神经元用于促进中枢神经损伤修复的新思路^[20-21, 36]。脊髓损伤会导致局部神经元不可逆性缺失,同时引起周围星形胶质细胞活化而大量增生,在损伤处形成致密的胶质瘢痕,从而抑制神经再生,造成永久脊髓神经功能障碍。Su 等^[36]构建了用于特异性感染星形胶质细胞的慢病毒载体,将转

录因子 Sox2 注射到脊髓损伤处周围,结果发现它能够将活化的星形胶质细胞直接转分化为神经元,而且这些诱导新生的神经元能够整合到脊髓已有的神经环路中。通过这种在体细胞基因重编程技术,可能可以抑制脊髓损伤后胶质瘢痕的形成、补充丢失的神经元,从而促进脊髓损伤修复。

细胞基因重编程的具体分子机制目前还不是很清楚,该过程是如何发生的还需要深入研究。另外,通过细胞基因重编程获得的神经元是否真正具有功能?它们能否在体内长时间存活?随着时间的推移,它们是否会重新退化成体细胞或其他细胞?如何提高细胞基因重编程的效率?如何获得治疗所需的特定类型神经元?所有这些问题都有待进一步研究、探索。虽然细胞基因重编程技术应用于临床中枢神经损伤修复还有很长的路要走,但是目前所取得的研究进展已给中枢神经损伤的治疗提供了新的思路。随着相关科学研究的不断深入,细胞基因重编程在中枢神经损伤的临床治疗中将具有良好前景。

6 展望

细胞基因重编程技术实现了从成体细胞向神经干细胞或各种类型神经元的转分化,解决了移植治疗中枢神经损伤时面临的细胞来源问题,在中枢神经损伤修复中具有广泛的应用前景。但该项技术目前还存在转分化较低、耗时长等问题,而且采用转录分子诱导细胞重编程有引起基因突变的风险。为了克服这些问题,未来需要对细胞基因重编程过程的具体分子机制进行深入研究,探索快速、高效、安全的细胞基因重编程策略。值得注意的是,最近研究发现一些小分子化合物能够诱导成体细胞通过细胞基因重编程获得神经干细胞或神经元,这将使其将来在临床上治疗中枢神经损伤成为可能。

[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: 663-676.
- [2] ALTMAN J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? [J]. *Science*, 1962, 135: 1127-1128.
- [3] ALTMAN J, DAS G D. Postnatal neurogenesis in the

- guinea-pig[J]. *Nature*, 1967, 214: 1098-1101.
- [4] GOULD E, TANAPAT P, MCEWEN B S, FLÜGGE G, FUCHS E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3168-3171.
- [5] ERIKSSON P S, PERFILIEVA E, BJORK-ERIKSSON T, ALBORN A M, NORDBORG C, PETERSON D A, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1313-1317.
- [6] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255: 1707-1710.
- [7] MCKAY R. Stem cells in the central nervous system [J]. *Science*, 1997, 276: 66-71.
- [8] KIM J H, AUERBACH J M, RODRÍGUEZ-GÓMEZ J A, VELASCO I, GAVIN D, LUMELSKY N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease[J]. *Nature*, 2002, 418: 50-56.
- [9] HAN D W, TAPIA N, HERMANN A, HEMMER K, HÖING S, ARAÚZO-BRAVO M J, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 465-472.
- [10] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131: 861-872.
- [11] MIURA K, OKADA Y, AOI T, OKADA A, TAKAHASHI K, OKITA K, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 743-745.
- [12] YUAN T, LIAO W, FENG N H, LOU Y L, NIU X, ZHANG A J, 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: 73.
- [13] DAVIS R L, WEINTRAUB H, LASSAR A B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts [J]. *Cell*, 1987, 51: 987-1000.
- [14] WEINTRAUB H, TAPSCOTT S J, DAVIS R L, THAYER M J, ADAM M A, LASSAR A B, et al. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 5434-5438.
- [15] IEDA M, FU J D, DELGADO-OLGUIN P, VEDANTHAM V, HAYASHI Y, BRUNEAU B G, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors[J]. *Cell*, 2010, 142: 375-386.
- [16] VIERBUCHEN T, OSTERMEIER A, PANG Z P, KOKUBU Y, SÜDHOF T C, WERNIG M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors[J]. *Nature*, 2010, 463: 1035-1041.
- [17] CAIAZZO M, DELL'ANNO M T, DVORETSKOVA E, LAZAREVIC D, TAVERNA S, LEO D, et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts[J]. *Nature*, 2011, 476: 224-227.
- [18] HEINRICH C, BLUM R, GASC N S, MASSERDOTTI G, TRIPATHI P, SÁNCHEZ R, et al. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons [J]. *PLoS Biol*, 2010, 8: e1000373.
- [19] TORPER O, PFISTERER U, WOLF D A, PEREIRA M, LAU S, JAKOBSSON J, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 7038-7043.
- [20] GUO Z, ZHANG L, WU Z, CHEN Y, WANG F, CHEN G. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model[J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 188-202.
- [21] NIU W, ZANG T, ZOU Y, FANG S, SMITH D K, BACHOO R, et al. *In vivo* reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain[J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 1164-1175.
- [22] SHENG C, ZHENG Q, WU J, XU Z, WANG L, LI W, et al. Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors[J]. *Cell Res*, 2012, 22: 208-218.
- [23] HEINS N, MALATESTA P, CECCONI F, NAKAFUKU M, TUCKER K L, HACK M A, et al. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5: 308-315.
- [24] HEINRICH C, GASCÓN S, MASSERDOTTI G, LEPIER A, SANCHEZ R, SIMON-EBERT T, et al. Generation of subtype-specific neurons from postnatal

- astroglia of the mouse cerebral cortex[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6: 214-228.
- [25] KAROW M, SÁNCHEZ R, SCHICHOR C, MASSERDOTTI G, ORTEGA F, HEINRICH C, et al. Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 471-476.
- [26] YANG N, ZUCHERO J B, AHLENIUS H, MARRO S, NG Y H, VIERBUCHEN T, et al. Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 434-439.
- [27] NAJMF J, LAGER A M, ZAREMBA A, WYATT K, CAPRARIELLO A V, FACTOR D C, et al. Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 426-433.
- [28] SON E Y, ICHIDA J K, WAINGER B J, TOMA J S, RAFUSE V F, WOOLF C J, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 205-218.
- [29] KIM J, SU S C, WANG H, CHENG A W, CASSADY J P, LODATO M A, et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 413-419.
- [30] MARRO S, PANG Z P, YANG N, TSAI M C, QU K, CHANG H Y, et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 374-382.
- [31] LUJAN E, CHANDA S, AHLENIUS H, SÜDHOF T C, WERNIG M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2527-2532.
- [32] THIER M, WÖRSDÖRFER P, LAKES Y B, GORRIS R, HERMS S, Opitz T, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 473-479.
- [33] RING K L, TONG L M, BALESTRA M E, JAVIER R, ANDREWS-ZWILLING Y, LI G, et al. Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 100-109.
- [34] SHENG C, ZHENG Q, WU J, XU Z, SANG L, WANG L, et al. Generation of dopaminergic neurons directly from mouse fibroblasts and fibroblast-derived neural progenitors[J]. *Cell Res*, 2012, 22: 769-772.
- [35] CHANDA S, ANG C E, DAVILA J, PAK C, MALL M, LEE Q Y, et al. Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3: 282-296.
- [36] SU Z, NIU W, LIU M L, ZOU Y, ZHANG C L. *In vivo* conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3338.
- [37] PFISTERER U, KIRKEBY A, TORPER O, WOOD J, NELANDER J, DUFOUR A, et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 10343-10348.
- [38] PANG Z P, YANG N, VIERBUCHEN T, OSTERMEIER A, FUENTES D R, YANG T Q, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors[J]. *Nature*, 2011, 476: 220-223.
- [39] AMBASUDHAN R, TALANTOVA M, COLEMAN R, YUAN X, ZHU S, LIPTON S A, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 113-118.
- [40] YOO A S, SUN A X, LI L, SHCHEGLOVITOV A, PORTMANN T, LI Y, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons [J]. *Nature*, 2011, 476: 228-231.
- [41] LADEWIG J, MERTENS J, KESAVAN J, DOERR J, POPPE D, GLAUE F, et al. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts[J]. *Nat Methods*, 2012, 9: 575-578.
- [42] LIU X, LI F, STUBBLEFIELD E A, BLANCHARD B, RICHARDS T L, Larson G A, He Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells[J]. *Cell Res*, 2012, 22: 321-332.
- [43] LIU M L, ZANG T, ZOU Y, CHANG J C, GIBSON J R, HUBER K M, et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 2183.
- [44] KIM Y J, LIM H, LI Z, OH Y, KOVLYAGINA I, CHOI I Y, et al. Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 497-506.
- [45] SU Z, ZANG T, LIU M L, WANG L L, NIU W, ZHANG C L. Reprogramming the fate of human glioma cells to impede brain tumor development[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1463.
- [46] FENG B, NG J H, HENG J C, NG H H. Molecules

- that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 301-312.
- [47] HUANGFU D, MAEHR R, GUO W, EIJKELBOOM A, SNITOW M, CHEN A E, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 795-797.
- [48] LYSSIOTIS C A, FOREMAN R K, STAERK J, GARCIA M, MATHUR D, MARKOULAKI S, et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 8912-8917.
- [49] ICHIDA J K, BLANCHARD J, LAM K, SON E Y, CHUNG J E, EGLI D, et al. A small-molecule inhibitor of TGF- β signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5: 491-503.
- [50] SHI Y, DESPONTS C, DO J T, HAHM H S, SCHÖLER H R, DING S, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 568-574.
- [51] SHI Y, DO J T, DESPONTS C, HAHM H S, SCHÖLER H R, DING S, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 525-528.
- [52] HOU P, LI Y, ZHANG X, LIU C, GUAN J, LI H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds [J]. *Science*, 2013, 341: 651-654.
- [53] CHENG L, HU W, QIU B, ZHAO J, YU Y, GUAN W, et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia[J]. *Cell Res*, 2014, 24: 665-679.
- [54] LI X, ZUO X, JING J, MA Y, WANG J, LIU D, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 195-203.
- [55] HU W, QIU B, GUAN W, WANG Q, WANG M, LI W, et al. Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 204-212.
- [56] MIKKELSEN T S, HANNA J, ZHANG X, KU M, WERNIG M, SCHORDERET P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis[J]. *Nature*, 2008, 454: 49-55.
- [57] HUANGFU D, OSAFUNE K, MAEHR R, GUO W, EIJKELBOOM A, CHEN S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 1269-1275.
- [58] SILVA J, BARRANDON O, NICHOLS J, KAWAGUCHI J, THEUNISSEN T W, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition[J]. *PLoS Biol*, 2008, 6: e253.
- [59] LIU K, SONG Y, YU H, ZHAO T. Understanding the roadmaps to induced pluripotency[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1232.
- [60] KUO C H, YING S Y. MicroRNA-mediated somatic cell reprogramming[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114: 275-281.
- [61] Bao X, Zhu X, Liao B, Benda C, Zhuang Q, Pei D, et al. MicroRNAs in somatic cell reprogramming [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25: 208-214.
- [62] LI Z, YANG C S, NAKASHIMA K, RANA T M. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation [J]. *EMBO J*, 2011, 30: 823-834.
- [63] ANOKYE-DANSO F, SNITOW M, MORRISEY E E. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 18): 4179-4187.
- [64] WANG Y, CHEN J, HU J L, WEI X X, QIN D, GAO J, et al. Reprogramming of mouse and human somatic cells by high-performance engineered factors [J]. *EMBO Rep*, 2011, 12: 373-378.
- [65] ANOKYE-DANSO F, TRIVEDI C M, JUHR D, GUPTA M, CUI Z, TIAN Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 376-388.
- [66] RHEE Y H, KO J Y, CHANG M Y, YI S H, KIM D, KIM C H, et al. Protein-based human iPS cells efficiently generate functional dopamine neurons and can treat a rat model of Parkinson disease[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2326-2335.
- [67] OKI K, TATARISHVILI J, WOOD J, KOCH P, WATTANANIT S, MINE Y, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain [J]. *Stem Cells*, 2012, 30: 1120-1133.