

成纤维细胞向运动神经元的分化研究进展

施玉婷¹, 李 峰^{2*}

- (1. 首都医科大学 2013 级长学制临床医学(儿科医学方向), 首都医科大学附属北京儿童医院, 北京 100013;
2. 首都医科大学神经生物学系, 北京脑重大疾病研究院, 北京神经再生修复研究重点实验室, 北京 100069)

【摘要】 脊髓性肌萎缩症、肌萎缩性侧索硬化症等运动神经元损伤性疾病, 目前尚无有效的治疗手段。随着多能诱导干细胞的出现和细胞重编程技术的发展, 将患者来源的成熟体细胞体外分化得到运动神经元进行自体移植成为一种充满希望的治疗途径。此外, 分化得到的运动神经元还可作为细胞模型, 用于疾病的机制研究和药物筛选。目前由成纤维细胞体外分化得到运动神经元的实验研究较多, 就经多能诱导干细胞或神经干细胞中间状态及直接转化这三类方法进行综述。

【关键词】 运动神经元; 成纤维细胞; 分化; 细胞重编程; 多能诱导干细胞

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0110-05

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 09. 020

Research progress on conversion of fibroblasts into motor neurons

SHI Yuting¹, LI Feng^{2*}

- (1. 2013 undergraduate, major in Long-term-system Clinical Medicine (Paediatric Medicine), Capital Medical University; Beijing Children Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100013, China.
2. Neurobiology Department of Capital Medical University; Beijing Institute for Brain Disorders; Beijing Center of Neural Regeneration and Repair, Beijing 100069)

【Abstract】 There is currently no effective treatment for some motor neuron diseases, such as spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. With the development of induced pluripotent stem cells and cell reprogramming technology, it is possible to induce the production of motor neurons from a patient's somatic cells *in vitro* for autologous transplantation. The differentiated motor neurons can also be used as cell models for studying disease mechanisms and for drug screening. Many researchers are now focusing on the differentiation of motor neurons from fibroblasts *in vitro*; here, we summarize three different methods for this, namely, differentiation through induced pluripotent stem cells, neural stem cells, and direct conversion.

【Keywords】 motor neuron; fibroblast; differentiation; cell reprogramming; induced pluripotent stem cell

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)和肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)等是一类不明原因的以运动神经元(motor neurons, MNs)进行性变性为主要特征的疾

病,会引起肌萎缩无力、运动障碍,甚至瘫痪、死亡。对此尚无有效的治疗方法,细胞替代治疗是当前研究的主要手段,移植细胞主要包括 MNs、神经干细胞(neural stem cells, NSCs)、胚胎干细胞(embryonic

【基金项目】 北京市教育委员会科技发展计划一般项目(编号:KM201510025001)。

【作者简介】 施玉婷(1995—),女,本科生,专业:长学制临床医学(儿科医学方向)。E-mail: 13260186607@163.com

【通信作者】 李峰(1973—),女,中级,博士,研究方向:神经发育和神经分化及神经退行性疾病。E-mail: gylfsd@126.com

stem cells, ESCs) 等。如何在体外获得大量上述细胞是问题的关键。

1998 年 11 月,威斯康星大学的科学家^[1]培育出了具有分化潜能的人 ESCs,可利用其得到靶细胞甚至靶器官用以移植。但在对 ESCs 的研究中发现,该细胞具有致癌性,异体移植存在免疫排斥,同时还存在伦理学争议,很大程度上限制了其应用。2006 年日本京都大学的 Yamanaka 等人^[2]将 4 个基因(*OCT4*, *SOX2*, *C-MYC*, *KLF4*) 导入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)内,转化得到形态和功能都和 ESCs 很相似的多能诱导干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),开创了细胞重编程技术的新时代。这种细胞来源于自身已成熟的体细胞,能避免免疫排斥。随后研究者们开始探索如何将已分化的细胞在特定条件下逆转为 iPSCs,或是直接得到靶细胞,如 MNs。本文就体外分化得到 MNs 的研究方法进行归纳和总结。

多种细胞均可用于体外分化,如间充质干细胞^[3]、骨髓细胞^[4]、成熟 B 淋巴细胞^[5],但因成纤维细胞易于获得,目前研究最多。本文探讨以下三种由成纤维细胞获得 MNs 的方法,即经 iPSCs 中间状态、直接转化和经 NSCs 中间状态。

1 成纤维细胞经 iPSCs 中间状态转化成 MNs

1.1 成纤维细胞转化成 iPSCs

迄今已有很多方法可将体细胞诱导为 iPSCs,包括体细胞核移植、细胞融合、细胞提取物重编程和直接重编程。其中,直接重编程是向体细胞内转入特定的转录因子或基因来诱导,如,*SOX2*、*OCT4*、*C-MYC*和 *KLF4*,它们都与细胞全能性或多能性的维持有关。细胞的转化效率和速度与体细胞的来源、转录因子、转入途径和培养条件等因素息息相关。有些体细胞在重编程的过程中易于获得较高的转化效率,这是由于不同分化程度和种类细胞的蛋白质和 DNA 结合紧密程度不同,导致外源性转录因子结合到细胞 DNA 中的难易程度不同。Yamanaka 等人^[2]所用的四因子是细胞重编程实验中的标准转录因子,用其他因子替换原本的一种或几种转录因子,也能实现细胞重编程,但转化时效可发生改变。比如有些体细胞自身可内源性表达一种或几种特定 Yamanaka 因子,不需要外源添加,如成纤维细胞可表达 *C-MYC* 和 *KLF4*,在重编程过程中就可不用添加 *KLF4* 因子,但会减小转化效率并延长转化时

间。2006 年 Yamanaka 等人^[2]成功得到 iPSCs 后,由 Takahashi 等^[6]、Brambrink 等^[7]、Kim 等^[8]、Ban 等^[9]、Mandal 和 Rossi^[10]等进行多项重编程实验陆续开展,他们通过把以 Yamanaka 因子为主的不同转录因子导入到逆转录病毒、慢病毒、仙台病毒、改良后的 mRNA 这几种载体中,将人成纤维细胞或脐带血细胞转化为 iPSCs,转化时间由 12 d 到 40 d 不等,转化效率由 0.001% ~ 4.4% 不等,进一步证实了重编程方法的可行性。

此外,利用一些小分子物质部分或者完全替代重编程因子可提高转化效率,由此得到的 iPSCs 被称为化学诱导多能诱导干细胞(chemically induced pluripotent stem cells, ciPSCs)。这些小分子物质通过调节细胞的表现遗传学、细胞信号通路、细胞凋亡、细胞衰老和代谢等机制来发挥作用^[11]。Hou 等人^[12]利用 7 种小分子完全替代外源性转录因子,成功地由 MEFs 得到 iPSCs,转化效率达到 0.2%,相比于 Yamanaka 等^[2]的转化方法(0.01% ~ 0.1%)效率提高将近 200 倍,这 7 种分子分别是 forskolin (FSK)、2-甲基-5 羟色胺(2-Me-5HT)、D4476、VPA、CHIR99021 (CHIR)、616452 和 tranilcypromine,前三种可以代替 OCT4,后四种可联合 OCT4 完成细胞重编程。不过迄今仍未有人源 ciPSCs 体外获得的报道。

1.2 iPSCs 转化为 MNs

iPSCs 转化成 MNs 的过程可以分成两个阶段,第一阶段通过向 iPSCs 培养基内添加不同的小分子得到拟胚体(embryoidbody, EB)或神经玫瑰花样结构(neural rosette),即神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs);第二阶段通过添加特定因子可将 NPCs 分化成为 MNs,这一过程主要依赖于 RA 的尾端化和 SHH 的腹侧化。

Santos 等人^[13]在 EB 培养阶段的第 1 ~ 7 天添加了 SB431542 和 DM,随后在培养的第 5 ~ 24 天添加 RA 和 SAG1.3(分别促进神经元的尾侧化和腹侧化),第 24 天选出单个细胞并将其置于 MNs 培养基中培养,2 d 后可得到有丝分裂后的 MNs,转化效率为 15% ~ 25%。

Shimojo 等人^[14]在分化早期应用 GSK-3 β 抑制剂和 SMAD 抑制剂,用以抑制细胞凋亡和促进细胞的分化增殖,一周内诱导得到表达 PAX6 和 SOX1 基因的 NPCs,随后应用 RA 和 purmorphamine 活化 SHH 信号通路以促进 NPCs 的分化和增殖,两周内

可得到表达 *HB9* 和 *ISL-1* 的 MNs, 之后在促进 MNs 成熟的培养基中培养 4 周, 可以得到成熟的 MNs。

iPSCs 技术在应用上的局限性主要体现在三个方面: 一是诱导过程复杂, 耗时较长 (一般为 3 ~ 4 周); 二是转化效率较低 (一般为 0.001% ~ 0.01%); 三是临床应用的安全性欠缺。在向供体细胞中引入外源基因时, 病毒载体可能将外源基因整合到细胞基因组中, 导致供体细胞发生基因突变, 此外, *C-MYC* 和 *KLF4* 是致癌基因, 因此 iPSCs 技术的安全性有待提高, 转入因子及载体的选择需进一步改进。

2 成纤维细胞体外直接转化为 MNs

细胞直接转化的第一个证据来源于 *PAX6*, 这个基因的缺失会影响前脑发育过程中神经元的形成, 而单个此基因能使从大脑皮层分离的神经胶质细胞转化成神经元^[15]。由此发现成熟细胞的分化状态是可逆的, 采用过表达转录因子或添加小分子等方法可改变细胞类型, 这种方法即为细胞直接转化。

2.1 单纯利用转录因子进行直接转化

20 世纪 80 年代, Davis 等人^[16]首次利用单一转录因子 *MYOD* (在内源性肌细胞分化过程中起重要作用的因子) 成功将 MEFs 转化为肌细胞, 给细胞直接转化技术的发展带来了希望, 随后研究者们陆续发现了一些新的转录因子。

Vierbuchen 等人^[17]首先找出了 19 种在神经发育过程中起重要作用的基因, 转入小鼠成纤维细胞, 成功得到诱导性神经元 (induced neuronal cells, iNs)。随后, 为减少转录因子数量, 他们利用 *BRN2*、*MYT1L*、*ZIC1*、*OLIG2* 和 *ASCL1* 五因子成功得到了有高度复杂形态的 iNs; 进一步实验证实 *BAM* (*BRN2*、*ASCL1*、*MYT1L*) 或 *BAZ* (*BRN2*、*ASCL1*、*ZIC1*) 三因子得到神经元的效率比五因子高 2 ~ 3 倍, 其中 *BAM* 三因子得到的神经元比 *BAZ* 三因子具有更复杂的生物学形态和功能特性。但该实验得到的神经元并不特异, 要得到 MNs 还需要添加额外的转录因子, 需要进一步的实验研究。

Son 等人^[18]首先挑选出 MNs 分化过程中起重要作用的 8 种转录因子 (*SOX1*、*PAX6*、*NKX6.1*、*OLIG2*、*NGN2*、*LHX3*、*ISL1*、*HB9*), 以及上述 *BAM* 三因子, 先后单独利用 *BAM* 三因子和 8 种 MNs 分化因子, 结果均未由 MEFs 直接得到 MNs, 而联合应用这 11 种因子能够获得 MNs。通过逐一排除, 最终确

定 7 因子转化体系 (*BAM* 三因子加上 *LHX3*、*ISL1*、*NGN2* 和 *HB9* 四种转录因子), 转化效率可达 5% ~ 10%。在此基础上若添加 *NEUROD1*, 就可将人成纤维细胞转化成 MNs。

Zhang 等人^[19]将上述 8 种转录因子 (包括 *NEUROD1*) 转入 SMA 患者的成纤维细胞可得到患者特异性的 MNs, 转染后第 43 天, 部分细胞可表达 MNs 标志物 *ISL1*、*CHAT* 和 *HB9*。在此实验中, 正常对照组和 SMA 组的转化效率分别是 5.5% 和 5.8%, 相差不大。但与对照组相比, SMA 组得到的诱导性 MNs (iMNs) 在第 45 ~ 48 天神经突起的生长速率显著减慢, 60 d 后神经元明显退化, 数量显著减少。这一结果与 SMA 患者的临床表现相一致, 证实了 SMA 的发生机制的确与运动神经元损害相关, 因此 iMNs 可作为 SMA 发病机制研究和药物筛选的细胞模型。

2.2 联合应用小分子和转录因子进行直接转化

由于单纯利用转录因子的转化效率较低, 研究者们开始寻找有效的小分子物质来提高转化效率。Liu 等人^[20]首先选出 7 种与神经元发育和存活相关的小分子, 尝试联合转录因子 *NGN2* 将人胚肺成纤维细胞 (human fetal lung fibroblasts, HFLFs) 转化成神经元, 结果证实 *FSK* 和 *DM* 能使 *NGN2* 将 HFLFs 成功转化成 MNs。但应用于出生后和成人的皮肤成纤维细胞, 获得神经元的效率很低, 添加转录因子 *SOX11* 和小分子 *FGF2*, 并将培养时间由 4 d 延长至 10 d, 能显著提高神经元的转化效率 (第 21 天 20.3% ~ 57.2% 表达 *TUJ1*), 与单独应用转录因子相比增高 4 ~ 10 倍。但此方法培养时间相对较长, 得到的胆碱能神经元不表达 *ISL1* 和 *LHX3* 这两种对于 MNs 发育非常重要的蛋白, Liu 等人^[21]在此基础上又用携有 *NGN2*、*SOX11*、*ISL1* 和 *LHX3* 的慢病毒载体感染 ALS 患者的皮肤成纤维细胞, 并添加小分子 *FSK*、*DM* 和 *FGF2*, 成功得到 ALS 患者的 iMNs。这种 iMNs 虽然具备一般 MNs 的细胞和电生理特性, 但存活困难、胞体缩小、活动度降低, 无法形成神经肌肉接头, 用于药物筛选实验, 结果发现小分子物质 *kenpaullone* 可以显著促进其树突向外生长, 恢复胞体大小, 并能使神经元的兴奋性趋于正常, 帮助提高其形成神经肌肉接头和控制肌肉运动的能力。

2.3 单纯利用小分子进行直接转化

应用载体携带外源基因进行细胞转染存在基

因整合突变的安全隐患,既然小分子物质部分替代转录因子能够提高细胞转化效率,有必要研究单纯利用小分子能否实现细胞直接转化。

Li 等^[22]首次单纯利用小分子物质 forskolin、ISX9、CHIR99021 和 I-BET151 进行小鼠成纤维细胞的转化,成功得到有原始神经元形态并能表达 TUJ1 的细胞,转化效率大于 90%,这种单纯应用化学物质转化得到的神经元被命名为化学诱导神经元(chemical-induced neurons)。此方法便于操作和标准化,可避免病毒载体带来的免疫原性和基因整合等安全性问题,是一种新的体外细胞直接转化的研究思路。

既往将小鼠成纤维细胞体外直接转化成 iNs 或 iMN_s 的实验多采用 BAM 这三种转录因子,而人成纤维细胞需要额外添加 NGN2,并且联合应用小分子物质的转化效率要显著高于单纯利用转录因子。成纤维细胞直接分化为 iMN_s 的方法相比于经过 iPSCs 这一中间状态来说转化时间更短,效率更高,但临床应用上存在缺陷,因为通常移植细胞的需求量大,而成熟 iMN_s 无法进行分裂增殖,所以患者能应用的体细胞数量有限,因此有必要考虑将成纤维细胞转变成可以大量增殖且具有多能性的 NSCs,再将其进一步分化为 MN_s。

3 成纤维细胞经 NSCs 这一中间状态分化为 MN_s

目前获得 iNSCs 的方法主要有两种:直接诱导法和间接诱导法。直接诱导法就是在体细胞内转入 NSCs 表达的特定基因,或者利用 microRNA 等其他小分子直接得到 iNSCs;间接诱导法就是在体细胞重编程为 iPSCs 的过程中改变诱导环境,使其成为 iNSCs。

3.1 直接诱导法

Zhu 等人^[23]用 OCT4 单个基因联合 A83-01、CHIR99021、NAB、LPA、rolipram 和 SP600125 成功将人成纤维细胞诱导成能表达 PAX6、NESTIN 和 SOX1 等泛神经化标志物的 iNSCs,4 周后可分化出成熟神经元,移植到小鼠脑内,无肿瘤形成。

Zhao 等和 Capetian 等^[24-25]将转录因子 OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28 和抑制 p53 基因表达的干扰 RNA 转入健康人的皮肤成纤维细胞内,在含有神经营养因子 bFGF、EGF 和 FGF4 的特定神经元培养基中培养,30 d 后得到 iNSCs。

3.2 间接诱导法

在 iPSCs 的诱导早期改变诱导环境,使其向 NSCs 方向发展即可间接获得 iNSCs。Lu 等人^[26]用携有 Yamanaka 四因子的仙台 RNA 病毒感染人成纤维细胞,再将其置于含有重组人白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)(一种与多种细胞的增殖分化相关的多功能细胞因子)、SB431542 和 CHIR99021 小分子的条件培养基中培养,可得到 LIF 依赖性 iNSCs(LIF dependent-iNSCs, LD-iNSCs)。但此细胞的神经分化潜能需要外源性转录因子持续存在才可维持,否则长期传代(> 20 代)会逐渐丧失其潜能。

Miura 等人^[27]利用携有 OCT4、KLF4、SOX2、L-MYC 和 NANOG 这五种基因的慢病毒转染人子宫内膜的纤维化基质细胞(endometrial fibrotic stromal cells),并将其置于含有 LIF 和 2i(MEK1/MEK2 抑制剂 PD0325901 和 GSK-3 β 抑制剂 CHIR99021)的培养基中继续培养,可得到人 LD-iNSCs,转化效率大概是 0.01%~0.03%。得到的 LD-iNSCs 可继续分化为 MN_s、多巴胺能神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,并能在体外扩增 100 代以上。

尽管通过直接或间接诱导将成纤维细胞转化为 iNSCs 的方法能增加 MN_s 数量,弥补直接转化的缺陷,但是实验过程比较复杂,转化效率相对较低,应用病毒载体存在安全性问题,因此此类方法仍有待完善。细胞分化中所用小分子物质及其作用的汇总见表 1。

4 存在问题及应用前景

自 2006 年 Yamanaka 等人^[2]首次利用 MEFs 得到 iPSCs 以来,细胞重编程技术逐渐兴起,各国学者从体细胞来源、转录因子、转入途径和培养条件等各个方面寻求突破,本文主要介绍了成纤维细胞体外转化得到 MN_s 的三类方法,其中由成纤维细胞体外得到胆碱能神经元的转化效率最高可达 95%^[20]。这些体外得到的 MN_s 不仅能用于运动神经元病的替代治疗,还可用于疾病发病机制的研究和药物筛选。

目前仍然有一些问题需要继续研究。一是载体的选择:尽管非基因整合载体没有基因整合过程,相对安全,但其转化效率相比于基因整合载体更低(除 mRNA 外),需要关注如何提高非基因整合

表 1 细胞分化中所用小分子物质及其作用

Table 1 Small molecules and their functions during cell differentiation

小分子物质 Small molecules	功能 Functions
Forskolin (FSK)	活化 cAMP 和 PKA 通路 Activating cAMP and PKA pathways
视黄酸 Retinoic acid (RA)	活化 RA 信号通路 Activating RA signal pathway
丙戊酸 Valproic acid (VPA)	抑制 HDAC 和 GSK3β, 活化 Notch-1 Inhibiting HDAC and GSK3β, and activating Notch-1
曲古柳菌素 A Trichostatin A (TSA)	抑制 HDAC Inhibiting HDAC
SB431542 (SB)	抑制 TGF-βR 和 Activin/TGF-β/SMAD 信号通路 Inhibiting TGF-βR and Activin/TGF-β/SMAD signal pathways
Dorsomorphin (DM)	抑制 BMP 和 BMP/SMAD 信号通路 Inhibiting BMP and BMP/SMAD signal pathways
Isoxazole 9 (ISX9)	促进神经前体细胞分化 Promoting differentiation of neural precursor cells
CHIR99021 (CHIR)	GSK3β 受体的选择性抑制剂 A selective inhibitor of GSK3β receptor
I-BET151	BET 蛋白家族的新型选择性抑制物 A new type of selective inhibitor of BET protein family
A83-01	TGF-β 抑制物 An inhibitor of TGF-β
丁酸钠 Sodium butyrate (NaB)	HDAC 抑制物 An inhibitor of HDAC
溶血磷脂酸 Lysophosphatidic acid (LPA)	磷脂衍生物, 可促进细胞分裂 Phospholipid derivative to promote cell division
Rolipram	PDE4 抑制物 An inhibitor of PDE4
SP600125	JNK 抑制物 An inhibitor of JNK

载体的转化效率问题;二是小分子物质的选择,虽然小分子物质应用于重编程技术能提高转化效率,但大多数小分子在重编程过程中的特定影响和作用机制并不清楚,不同的小分子可能会相互影响或者对人体产生毒性,因此在临床应用上受到限制,应用的最适浓度、暴露时间、协同效应等方面都需要更多的研究。总之,利用已成熟的体细胞体外分化得到运动神经元的工作意义重大且仍需深入。

参考文献:

[1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145 – 1147.

[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] Yousefi B, Sanooghi D, Faghihi F, et al. Evaluation of motor neuron differentiation potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, *in vitro* [J]. J Chem Neuroanat, 2017, 81: 18 – 26.

[4] Abdullah RH, Yaseen NY, Salih SM, et al. Induction of mice adult bone marrow mesenchymal stem cells into functional motor neuron-like cells [J]. J Chem Neuroanat, 2016, 77: 129 – 142.

[5] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency [J]. Cell, 2008, 133(2): 250 – 264.

[6] 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.

[7] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 151 – 159.

[8] 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.

[9] Ban H, Nishishita N, Fusaki N, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(34): 14234 – 14239.