

诱导多能干细胞与中枢神经系统疾病模型

郭焯¹, 汪泱² 综述 邓志锋² 审校

1. 南昌大学第二附属医院神经外科, 江西省南昌市 330006

2. 上海交通大学附属第六人民医院, 上海市 200233

摘要: 重编程患者体细胞建立相关患者特异性诱导多能干细胞(iPS 细胞)模型, 对研究中枢神经系统疾病的发病机理、药物筛选及进一步自体移植治疗意义深刻。本文重点讨论了利用重编程技术建立脊髓性肌萎缩症、帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、雷特综合征、精神分裂症等 6 种常见中枢神经系统疾病 iPS 细胞模型的最新进展, 同时概述了该领域目前面临的问题。我们相信疾病特异性 iPS 细胞模型的建立, 必将有助于中枢神经系统疾病的早期诊断及治疗。

关键词: 诱导多能干细胞; 中枢神经系统疾病; 细胞模型

目前, 人类对中枢神经系统疾病的研究主要集中在整体、器官和细胞三个水平。然而, 传统的动物模型(如小鼠)并不能完全概括人类神经细胞的表型特征; 此外, 神经病理学虽然时至今日仍在中枢神经系统疾病鉴定及其神经功能损害程度判断中扮演着重要角色, 但这种方式通常不具有预见性, 也仅代表了疾病的终末阶段; 研究者如果想要观察某一神经系统疾病(如帕金森病人的多巴胺神经元等)的特异性神经元表型及其在疾病形成过程的变化, 这类实验所需的细胞则不能取自病人的大脑组织, 只能通过培养特异性神经细胞株获得, 因此建立中枢神经系统疾病细胞模型对深入研究相关疾病的发病机制十分必要。它的建立使直观详细地研究人类神经元的发育进程成为现实, 人们可以观察中枢神经病变发生之前和开始之初的疾病特异通路的变化; 同时检测中枢神经系统疾病相关神经细胞特异性分子标志的表达, 为特异性神经系统疾病检测工具的发现及早期干预治疗带来了希望。

1 利用诱导多能干细胞建立中枢神经系统疾病特异性细胞模型的可行性和优势

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)可分化为多种亚型的神经细胞, 然而其来源稀少且再生能力低下, 体外培养与获取均相当困难。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, bMSCs)在体外可分化成神经细胞, 然而 bMSCs 的神经诱导效率十分有限。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)是

从早期胚囊分离出的高度未分化的具有无限增殖特性的多能干细胞, 可在体外高效诱导成包括神经干细胞在内的多种细胞, 但由于人 ES 细胞取自胚胎, 其获取与应用面临巨大的伦理问题。

2006 年, 日本山中伸弥(Yamanaka)等^[1]利用逆转录病毒为载体将 4 种转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4)导入小鼠胚胎成纤维细胞和鼠尾成纤维细胞, 成功重编程得到一种具有无限增值特性和多胚层分化潜能的干细胞, 命名为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。2007 年, 山中伸弥等^[2]与美国 Thomson 实验室^[3]几乎同时又重编程获得了人 iPS 细胞。iPS 细胞可在体外经 SHH、RA 等的诱导下分化为运动神经元^[4]、多巴胺神经元^[5]、胶质细胞^[6]等多种类型神经细胞, 同时还避开了 ES 细胞所面临的伦理问题, 是目前研究人类中枢神经系统疾病的理想工具细胞。更重要的是, 获得疾病特异性 iPS 细胞不仅可以得到该病人的遗传物质, 而且其后分化的神经细胞还包含了该病发生过程起重要作用的基因修饰和突变, 为下一步进行中枢神经系统疾病新型靶向药物的筛选和移植治疗研究提供可能。目前围绕建立中枢神经系统疾病特异性 iPS 细胞模型, 国内外已进行了大量研究(见表 1)。

2 iPS 在中枢神经系统疾病模型的研究进展

2.1 iPS 与脊髓性肌萎缩症

人类构建的第一个中枢神经系统疾病 iPS 细胞模型是脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy,

基金项目: 国家自然科学基金(81160154); 江西省自然科学基金(2010GZY0256); 江西省科技厅创新团队建设计划(20113BCB24018)

收稿日期: 2012-07-09; **修回日期:** 2012-11-12

作者简介: 郭焯(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事脑缺血性疾病基础及临床应用的研究。

通讯作者: 邓志锋(1963-), 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事鞍区肿瘤及脑血管病的基础及临床研究。电子邮箱: deng-zf63@126.com。

表1 已建立 iPS 细胞模型的相关中枢神经系统疾病

| 疾病名称 | 致病基因 | 参考文献 |
|--------------|----------|------------|
| 脊髓性肌萎缩症(SMA) | SMN1 | [7] |
| 帕金森病 | LRRK2 | [8,9,33] |
| | SNCA | [9] |
| 阿尔茨海默病 | PS1, PS2 | [12,33] |
| 肌萎缩性脊髓侧索硬化症 | VAPB | [14,33] |
| | SOD1 | [13,15,33] |
| 雷特综合征 | MECP2 | [18,19,33] |
| 精神分裂症 | DISC1 | [21,33] |

SMA)。为了建立 SMA-iPS 模型, Ebert 等^[7] 重编程获得了 SMN1 (编码人类运动神经元存活蛋白的主要基因) 突变儿童的 iPS 细胞, 与正常对照组相比, 该患儿成纤维细胞及 iPS 细胞中 SMN 蛋白的表达均下降, 并且其衍生运动神经元的数量较少、体积也明显较小, 该运动神经元在体外的存活时间通常也不会超过6周; 同时还发现 SMA 运动神经元中包含 SMN 的核内聚体结构——gem 表达下降。他们在接下来的研究中还证实, 给予丙戊酸和妥布霉素等已在 SMA 小鼠模型中证实可上调 SMN 表达的药物后, 衍生神经元中 SMN 的表达增加, 同时在一定程度上减少了 SMN 蛋白的丢失, 并且 gem 的数量也显著增加, 这些对改善 SMA 症状都具有积极作用; 但这两种药物是否能增加神经元的存活时间, 还有研究人员的待进一步验证。

2.2 iPS 与帕金森病

虽然研究人员已经利用小鼠模型和病人尸检分析对帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的发病机制进行了深入探讨, 然而前者并不能完全再现 PD 的特征, 后者又仅仅反映了 PD 的终末期改变, iPS 模型的建立使这种状况得到改善。成功获得 PD 病人 iPS 细胞株的案例早有报道, 然而他们大多主要集中在诱导方法的研究。Nguyen 等^[8] 第一次对 PD 病人 iPS 细胞株衍生多巴胺能神经元的相关生物学特性进行了研究, 其所用 iPS 细胞来自 LRRK2 基因点突变 (PD 病人最常见的突变) 的 PD 病人, 并采用未突变 iPS 细胞株做平行对照。研究发现, PD 病人多巴胺能神经元的 α -突触核蛋白 (该蛋白的功能紊乱在 PD 病人普遍存在) 表达水平明显增高, 并且增加了细胞对过氧化氢、MG-132 和 6-羟多巴胺的敏感性。Blake 等^[9] 的研究同样证实了这一点, 同时他们还发现 LRRK2-G2019S 突变和 SNCA 三倍体病人 iPS 分化的多巴胺神经元能更好的重现 PD 的早期病变。然而, 利用激酶抑制剂干扰 LRRK2 活化后并没有阻止这种现象的发

生。Seibler 等^[10] 研究发现, 神经元线粒体蛋白 PINK1 发生基因突变的 PD 病人 iPS 细胞分化的多巴胺神经元, Parkin 介导的线粒体趋化能力下降同时伴随细胞内线粒体数目增多; 随后通过建立的 PD 病人 iPS 细胞模型证实, 这种现象可通过增强野生型 PINK1 基因的表达得以改善。然而, 治疗 PD 的其他潜在分子靶点还需要人们的不懈探索。

2.3 iPS 与阿尔茨海默病

在重编程技术出现之前, 虽然建立了很多阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 体内、外模型, 但是难以完全反映 AD 的病理生理过程。Park 等^[10, 11] 建立了第一个 AD 特异性 iPS 细胞株, 不仅为建立 AD 细胞模型奠定了基础, 更重要的是他还发现建立年龄相关性中枢神经系统疾病 iPS 模型是十分困难的。早老蛋白 1 (PS1) 和早老蛋白 2 (PS2) 突变是早发型家族性 AD (FAD) 的病因之一。Takuya 等^[12] 通过重编程 PS1 和 PS2 突变 FAD 病人成纤维细胞获得了 FAD 病人特异性 iPS 细胞, 即 FAD-iPSC, 并在随后进行了神经定向诱导分化。研究发现与正常水平相比 FAD-iPSC 衍生神经元 A β 42 蛋白分泌增加, 这可能就是早老蛋白突变引发 FAD 的分子机制。此外, Takuya 还发现这些神经元 A β 42 蛋白的分泌受 γ 分泌酶抑制剂及其调控因子的影响十分明显, 这就为我们进行鉴定 FAD 及其潜在靶向治疗药物的发现奠定了基础; 同时 FAD-iPSC 的获得也为其他年龄相关性神经退行性疾病细胞模型建立了信心。

2.4 iPS 与肌萎缩性脊髓侧索硬化症

肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 牵涉到的基因多达 10 种以上, 包括超氧化物歧化酶 1 (SOD1 和 ALS1)^[13] 和修复相关蛋白 B/C 的 (VAPB 和 ALS8)^[14]。Dimos 等^[15] 利用发生 SOD1 (SOD1^{L44F}) 基因突变的一对八十多岁姐妹的体细胞重组获得 iPS 细胞, 并从其中一株 iPS 分化得到了运动神经元, 但他们并没有分析该运动神经元的表型特征, 也没有与未突变病人的神经元进行对比。Mitne-Neto 等^[16] 报道, 他们重编程得到 4 个 VAPB 基因突变的 ALS 病人 iPS 细胞株, 并与 3 个未突变 iPS 细胞株对比发现, 突变 iPS 株 (特别是其衍生细胞的运动神经元富集区) VAPB 蛋白水平严重下降, 这表明 VAPB 的减少可能参与 ALS 退行性变的起始阶段。最近 Anagnostou 等^[17] 报道称基因突变未确定的散发型 ALS 中 VAPB 蛋白表达减少, 这些研究均表明 VAPB 蛋白与 ALS 密切相关。目前有研究证明一些运动神经元的基质细胞 (星形胶质

细胞和小胶质细胞等)在 ALS 发病中扮演重要角色,iPS 衍生的相关基质细胞是否也可模拟非致病细胞的相关作用仍然有待观察。

2.5 iPS 与雷特综合征

雷特综合征(Rett syndrome, RTT)是由人类甲基化 CPG 结合蛋白 2(methyl-CpG-binding protein-2, MECP2)基因突变所致。目前已有两个研究小组^[18, 19]分别利用 RTT 病人 iPS 细胞株衍生的神经细胞研究证实,相关神经细胞的表型特征与 RTT 动物模型和 RTT 病人死后脑组织病理检查一致;此外,两个小组均发现 RTT-iPSC 衍生神经元的体积较正常对照组明显减小。他们还利用电生理技术证实 RTT 病人谷氨酸能神经接头的数量严重减少,这意味着 RTT 病人的神经网络存在通讯障碍。此外,研究人员还发现胰岛素样生长因子(已证明能有效修复 RTT 小鼠表型)可改善 RTT 病人 iPS 诱导神经元的表型,为缓解 RTT 病人神经突触抑制现象提供了可能。Muotri 等^[20]通过抑制 RTT 病人 iPS 衍生神经前体细胞(NPC)MeCP2 活化验证了 RTT 形成机制,然而其他 RTT 病人 iPS 源性神经细胞是否与该 iPS 细胞株衍生神经细胞的表型相同还有待进一步研究。虽然目前建立的 RTT-iPSC 细胞模型还十分有限,但其在 RTT 研究中的巨大潜力已经展现。

2.6 iPS 与精神分裂症

虽然精神分裂症(schizophrenia, SCZD)明显的临床症状通常出现在青春期后期或成年早期,但目前越来越多的研究证实认知功能受损往往出现在相关症状发作之前。Chiang 等^[21]建立了第一个 DISC1 突变(一种罕见的单基因突变)SCZD 患者的 iPS 细胞株,但该细胞株尚未分化成神经元。Brennan 等^[22]在 2011 年成功获得 4 例多基因突变 SCZD 病人 iPS 细胞株,并进行了神经元诱导分化。经研究发现 SCZD 病人 iPS 衍生神经元间的突触连接明显减少,体细胞与神经突触之间的连接也减少;与正常人对照组相比树突蛋白 PSD95 表达水平降低,还伴有 cAMP 和 WNT 信号通路的基因表达谱的改变。随后的研究中他们还发现向培养基中加入抗精神病药物后,SCZD-iPS 衍生神经元突触连接的数量增加,并且基因表达谱变异也得到改善,这就为我们利用抗精神病药物治疗精神分裂症提供了有力证据;同时,SCZD-iPS 细胞模型的建立也为下一步开发新的 SCZD 治疗药物提供了细胞工具。

3 建立中枢神经系统疾病 iPS 模型面临的挑战

iPS 细胞模型的建立为研究中枢神经系统疾病

发病机制及致病假说提供了新工具。然而,iPS 技术在广泛用于神经系统疾病建模之前,还有许多问题有待解决。目前 iPS 的重编程效率还不高,而且越来越多的研究人员也注意到了 iPS 细胞出现的各种变异,如异倍体含量增加^[23]、X 染色体失活^[24]、异常表观遗传重组^[25]、点突变和拷贝数改变^[26, 27]等。另外,遗传/表观遗传不稳定也会影响 iPS 的神经分化潜能^[28, 29],这些改变多是由于重编程转录因子所需病毒载体的大量使用造成的,但非转染方法是否会减少这种变异的出现目前还不清楚。因此,目前我们还不能确定 iPS 培养过程中观察到的各种变异是否会影响建模的成功。

此外,提高 iPS 细胞的定向诱导分化效率对发挥中枢神经系统疾病特异性 iPS 细胞模型作用至关重要。目前研究人员正努力探索神经细胞培养所需的各种生长因子的浓度与组合,以更好的进行特异神经元的定向诱导。令人振奋的是,在 ALS^[30, 31]发病过程中起重要作用的脊髓运动神经元及与 PD^[32]密切相关的中脑多巴胺神经元的诱导分化已取得巨大进步。

4 展望

iPS 的出现是医学领域的重要里程碑,山中伸弥也因此获得了 2012 年诺贝尔生理学医学奖。利用 iPS 建立中枢神经系统相关疾病细胞模型,对研究中枢神经退行性疾病、神经发育障碍及一些精神疾病发生、发展规律意义重大。然而 iPS 技术目前仍在发展完善过程中,我们相信 iPS 技术结合建立小鼠模型、基因测序和 CT、磁共振成像、临床数据分析等其他技术,必将有助于我们对中枢神经系统疾病的认识及治疗方法的改进。

参 考 文 献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [2] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [3] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [4] Martin LJ, Chang Q. Inhibitory synaptic regulation of motoneurons: a new target of disease mechanisms in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurobiol*, 2012, 45(1): 30-42.
- [5] Cooper O, Hargus G, Deleidi M, et al. Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral mid-

- brain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(3): 258-266.
- [6] Emdad L, D'Souza SL, Kothari HP, et al. Efficient differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells into functional astrocytes. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(3): 404-410.
 - [7] Ebert AD, Yu J, Rose FJ, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457(7227): 277-280.
 - [8] Nguyen HN, Byers B, Cord B, et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(3): 267-280.
 - [9] Byers B, Lee H, Reijo Pera R. Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2012, 12(3): 237-242.
 - [10] Seibler P, Grazilot J, Jeong H, et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci*, 2011, 31(16): 5970-5976.
 - [11] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886.
 - [12] Yagi T, Ito D, Okada Y, et al. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(23): 4530-4539.
 - [13] Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993, 362(6415): 59-62.
 - [14] Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, et al. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet*, 2004, 75(5): 822-831.
 - [15] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-1221.
 - [16] Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, et al. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(18): 3642-3652.
 - [17] Anagnostou G, Akbar MT, Paul P, et al. Vesicle associated membrane protein B (VAPB) is decreased in ALS spinal cord. *Neurobiol Aging*, 2010, 31(6): 969-985.
 - [18] Chen YJ, Zhang M, Yin DM, et al. ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons is critical for neuregulin 1 regulation of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(50): 21818-21823.
 - [19] Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D, et al. Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(11): 2103-2115.
 - [20] Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*, 2010, 468(7322): 443-446.
 - [21] Chiang CH, Su Y, Wen Z, et al. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry*, 2011, 16(4): 358-360.
 - [22] Brennand KJ, Simone A, Jou J, et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 473(7346): 221-225.
 - [23] Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4): 521-531.
 - [24] Bruck T, Benvenisty N. Meta-analysis of the heterogeneity of X chromosome inactivation in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*, 2011, 6(2): 187-193.
 - [25] Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471(7336): 68-73.
 - [26] Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471(7336): 63-67.
 - [27] Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 2011, 471(7336): 58-62.
 - [28] Hu BY, Weick JP, Yu J, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9): 4335-4340.
 - [29] Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, et al. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(3): 279-286.
 - [30] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618-630.
 - [31] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-1221.
 - [32] Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3): 275-280.
 - [33] 韩发彬. 诱导多能干细胞及其在神经退行性疾病研究中的应用. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(5): 403-414.