

成纤维细胞向神经细胞转分化的研究进展

邵东传 综述 龙江 审校

昆明医科大学第一附属医院神经外一科,云南 昆明 650032

摘要:自从将一种成体细胞转化为另一类型的成体细胞技术的出现,成纤维细胞转分化为神经细胞技术在神经系统领域迅速发展及为神经系统疾病损伤的修复带来了希望。本文就近几年由成纤维细胞直接或间接诱导转化为各神经功能神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞、施旺细胞等重要研究成果做一归纳和总结,并对其前景进行展望。

关键词:成纤维细胞;直接转分化;间接转分化;诱导神经元;诱导前体细胞;胶质细胞

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2016.02.024

创伤、卒中、退行性改变引起的神经系统疾病,其病理改变是神经细胞变性、凋亡、坏死,从而导致神经功能缺失,其神经损伤的修复是全世界所面临的一个难点。自从在体外成功分离培养出人类胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞后,掀起了干细胞研究的热潮。然而 ESCs 受伦理限制,而成体干细胞因分离纯化困难、分化能力有限、免疫排斥等缺点,阻碍了干细胞研究的发展。2006 年 Takahashi 将用特异性转录因子转染小鼠的成纤维细胞获得了具有多向分化潜能的 ESCs 样细胞,即诱导性多潜能干细胞(iPSCs)。虽其规避了伦理学限制,但其诱导效率低,操作过程复杂且致癌性强。2010 年 Vierbuchen 等^[1]用 Ascl1、Brn2/4、Myt1L (ABM) 转录因子将源于小鼠中胚层成纤维细胞转化为外胚层的诱导神经元(induced neurons, iNs),第一次实现细胞间跨胚层的转化。因成纤维细胞具有部分神经外胚层的特性和易于获得特点,其成为诱导神经细胞的首选起始细胞^[2]。本文对成纤维细胞向神经细胞转分化研究现状做一综述。

1 转分化的主要诱导物

1.1 特异性转录因子

在胚胎发育早期细胞内过度表达且对决定细胞命运起重要作用的内源性基因,通过其激活下游转录因子,同时使 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化等表观遗传学修饰也发生改变,最终导致细胞命运转变^[3,4]。特异性转录因子在细胞发育分化中起到主

导和触发启动转分化的作用,即使去除转录因子,转分化细胞仍维持稳定状态。文献^[5]报道外源基因失活 24 d 后,诱导多巴胺能神经元仍能表现出其功能特性。

1.2 RNA (miRNA)、小分子

因成熟细胞之间的转分化并不需要以外源基因的整合为前提,借助瞬时表达的转录因子激活成熟细胞内沉默的特定基因,且可以特异性地关闭其它的基因,完全可以启动细胞重编程的过程。

1.2.1 MicroRNAs MicroRNA 虽不能翻译蛋白质,但在干细胞增殖、细胞周期进展中发挥重要作用,可诱导多种初始细胞向目的细胞直接转分化。Yoo 等^[6]将人成纤维细胞高表达 miR-9/9* 和 miR-124 联合导入 Ascl1、Myt1L、NeuroD2 有效地转化为 iNs。甚至有学者^[7]仅利用 miRNA124 将成纤维细胞直接转化为神经元。Zhou 等^[8]发现多全能干细胞特异性 microRNA 302/367 家族联合 miRNA-9/9*、miRNA-124 将人皮肤成纤维细胞高效地转化功能神经元。

1.2.2 小分子 小分子化合物也可以通过结合细胞表面相应细胞因子受体,启动复杂的细胞内分子间的相互作用,最终引起细胞基因转录的变化从而发挥生物学作用。小分子 Dai 等^[9]首次用 6 个明确的化合物将成纤维细胞转化为 iNs,其转化效率高达 80%,且其功能不受细胞供体年龄和细胞增殖代数的影响。Xu 等人^[10]在没有用转录因子和 RNA 的条件下,将大鼠成纤维细胞在 NT3-OECs、

基金项目:2015 年云南省科技厅-昆明医科大学运用基础研究联合资金项目《epsin1/2 在非小细胞肺癌脑转移中影响血脑屏障开放的分子机制研究》(项目号:2015FB033)

收稿日期:2015-10-17; **修回日期:**2016-02-29

作者简介:邵东传(1989-),男,住院医师,硕士,从事颅内肿瘤和脑血管疾病的基础研究。

通讯作者:龙江(1969-),男,主任医师,博士,研究方向:颅内肿瘤和脑血管疾病的诊断和治疗。

SB431542、GDNF、RA 制成的联合培养基中诱导 3 周,将其诱导分化为功能性的氨基丁酸能神经元。Hu 等^[11]用七个小分子化学片段将正常人或者阿尔茨海默病患者皮肤成纤维细胞转分化为神经元。

2 成纤维细胞转化为神经元

2.1 直接转分化

是将一种类型的成体细胞直接跨谱系转换为另一种类型的成熟细胞。绕过了多潜能或前体细胞过程,降低了体外操作的复杂性、致癌的风险和免疫排斥反应,缩短诱导时间,避免 ESCs 所涉及的伦理问题。转化的神经元不仅要形态、基因表达上符合神经元的特点,更重要的是形成功能性的神经元,这样才有实际研究价值。

2.1.1 诱导多巴胺能神经元 (induced dopaminergic neurons, iDAs) 帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是中脑黑质多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元的变性坏死,从而引起纹状 DA 含量显著性减少,严重危害老年人的一种神经系退行病变的疾病。如何修复和再生持续分泌多巴胺的神经元成为治疗该疾病的关键。Pang 等^[12]在 ABM 组合基础上添加了 NeuroD1 转录因子,成功地将人胎儿的成纤维细胞转分化为大约 9% 酪氨酸羟化酶阳性的 iDAs。Ambasudhan 等^[13]运用 miR-124 联合 Brn2、Myt1L 两种神经转录因子将新生儿成纤维细胞直接转化为 iDAs,但是两者获得转化效率低下。Pfisterer 等^[14]运用在 ABM 组合基础上添加 Lmx1a、FoxA2,提高了转化的效率。但上述研究未深入研究 iDAs 的功能特性。Caiazzo 等^[5]用慢病毒携带 Ascl1、Nurr1、Lmx1a 转录因子成功地将小鼠成纤维细胞转化为具有神经电生理特性和摄取多巴胺能力的 iDAs,同时将 PD 患者和健康成人地成纤维细胞成功的转化 iDAs,实现了 PD 患者自体细胞转分化。2011 年 Kim 等^[15]用 Pitx3、Ascl1 将大鼠胎儿成纤维细胞转化为 iDAs 并将其移植到 PD 大鼠模型受损的纹状体中,提高了其多巴胺水平,改善了运动障碍。2014 年 Dell'Anno 等^[16]将由 Ascl1、Nurr1、Lmx1a 诱导的 iDAs 移植到体内发现它可以在体内长期存活且改善 PD 小鼠模型的运动功能障碍。

2.1.2 诱导运动神经元 (induced motoneurons, iMNs) 如脊髓性肌萎缩、肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 等外周神经性神经疾病,其运动神经元受损,如何修复或者再生运动性神经元成为治疗该类疾病的关键。Son 等^[4]用 BAM 组合联合 Lhx3、Hb9、

Isl1、Ngn2/Lhx3、Hb9、Isl1、Ngn2、NeuroD1 运动神经元特异性因子将大鼠和人成纤维细胞转化为具有神经电生理特性和突触形成的 iMNs,转化效率约为 5% ~ 10%,将其移植到 SOD1 突变的肌萎缩侧索硬化小鸡模型的脊髓腹侧区域中,发现约有 80% 存活神经元从脊髓前角神经根向周围肌肉组织伸出轴突。2013 年 Liu 等^[17]仅用 Ngn2、Forskolin、Dorsomorphin/Sox11 导入人胎儿成纤维细胞和 ALS 患者的成纤维细胞转化为 iMNs。

2.1.3 其它神经元 2015 年 Blanchard 等^[18]将 Brn3a、Ngn1 或者 Brn3a、Ngn2 将小鼠及人成纤维细胞转分化为具有痛觉、温觉、触觉特性且具有感觉神经元的形态、电生理活动特点的外周感觉神经元。亨丁顿舞蹈症是一种尾状核和壳核中的中间多刺状神经元 (MSNs) 凋亡的退行性病变,Victor 等^[19]将 miRNA (mir9/9、mir-124) 结合 BCL11B、DLX1、DLX2、MYT1L 转录因子转染成纤维细胞,诱导产生了类似 MSNs 的神经元,移植到大鼠纹状体内存活超过 6 个月且功能性地整合到相应靶器官。

2.2 间接转分化

直接转分化存在效率较低,扩增能力有限,移植后的存活率低和难于功能性地整合到移植体内等不足。为此人们提出了间接转分化观点,即将成熟细胞转分化至一种可塑性的中间状态,再进行诱导分化,如在成体细胞诱导为干细胞或前体细胞。

2.2.1 诱导神经前体细胞 (induced neural progenitor cells, iNPCs) 因直接转分化神经元扩增能力有限,Kim 等^[20]在小鼠成纤维细胞中短暂性高表达 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 四个转录因子,在含有 FGF2、EGF、FGF4 的培养基中将其诱导成 iNPCs,但是其扩增不超过三代,且它不能分化为少突胶质细胞。为克服这些局限性,Lujian 等^[21]向 Sox2-EGFP 小鼠胚胎成纤维细胞中转入 11 种神经干细胞特异性转录因子,经筛选发现 Sox2、FoxG 即可诱导产生具有自我更新能力和双向分化能力的 iNPCs,如再加入 Pou 及 Brn2 可产生具有三向分化能力的 iNPCs。2014 年 Cheng 等^[22]在低氧条件下运用 VPA、CHIR99021、Repsox 将大鼠胚胎成纤维细胞转化为 iNPCs。2015 年 Lim 等人^[23]用 BAM、Bcl-xL 将成纤维细胞转分化为增殖能力超过 100 代的 iNPCs,在加入 Nurr1、Foxa2 两个转录因子将 INPS 转化为具多巴胺神经功能的中脑多巴胺能神经元,且深入地评估了 iNPCs 移植到帕金森小鼠模型中的治疗效果。

Tian 等^[24]用 Brn2、Sox2、Foxa2 转录因子将大鼠成纤维细胞转化为诱导多巴胺能前体细胞,将其移植 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中分化为 iDAs,并未转化为星形胶质细胞和瘤细胞,且小鼠多巴胺神经元轴突末端缺失和运动障碍得到改善。

2.2.2 神经限制性前体 因诱导神经元在移植到体内存活率低且增殖能力有限,且神经干细胞、前体细胞移植到体内主要向胶质细胞分化,仅很少一部分向功能神经元分化。Zhou 等^[25]用三个神经转录因子 Sox2、c-Myc、Brn2 / Brn4 将成纤维细胞转分化为神经限制性前体细胞。其有较强的再生和迁移能力且只向神经元分化。

2.2.3 诱导神经干细胞(induced neural stem cells, iNSCs) 文献^[26]报道诱导的神经干细胞具有极强的可塑性、再生分化能力且具有抗炎、抗凋亡、免疫调节等作用。Their 等^[27]将 Sox2、Klf4、c-Myc 三个转录因子在小鼠成纤维细胞中持续高表达而短暂表达 Oct4,诱导出可扩增 50 代以上的 iNSCs。2014 年 Kim 等^[28]用逆转录病毒将 Pou3f4、Sox2、Klf4、Myc 四个转录因子导入成纤维细胞 4~5 周后,将其诱导为功能性 iNSCs。

3 成纤维细胞转分化的胶质细胞

3.1 诱导星形胶质细胞

星形胶质细胞是中枢神经中数量最多且具有再生修复功能的胶质细胞。2014 年 Molofsky 等^[29]发现星形胶质细胞在神经回路的发育和维持中具有独特的作用,其异常可能引起类似 ALS 的神经系统退行性疾病,甚至还包括自闭症和精神分裂症等。文献^[30]报道显示星形细胞移植治疗有利于退行性疾病的改善。Caiazzo 等^[31]在多种转录因子中筛选出 NFIA、NFIB、SOX9 能将胎儿及新生大鼠成纤维细胞转化为功能性的诱导星形胶质细胞。

3.2 诱导少突胶质细胞(induced oligodendrocyte cells, iOCs)

少突胶质细胞在中枢神经系统中包绕轴突形成绝缘的髓鞘结构,协助神经电信号传递,维持和保护神经元的正常功能,其异常可导致中枢神经系统脱髓鞘病变,如多发性硬化症等。修复和再生少突胶质细胞是治疗该类疾病的关键。Lujan 等^[21]将成纤维细胞直接转化为 iOCs 且整合到脱髓鞘的大脑中。因诱导效率低下,Najm 等^[32]用 Sox10、Olig2、Nkx6.2 先将小鼠成纤维细胞转化为诱导少突胶质前体细胞(induced oligodendrocyte precursor cells,

iOPCs),然后将其诱导为 iOCs。2013 年 Yang 等^[33]将小鼠成纤维细胞转染经筛选 Sox10、Olig2、Zfp536 三个最佳转录因子诱导制备出高效的 iOPCs,将其移植到髓鞘碱性蛋白基因敲除小鼠模型的胼胝体和小脑内可分化为成熟少突胶质细胞并形成髓鞘包裹轴突,为因少突胶质细胞的受损而引起脱髓鞘的疾病带来希望。

3.3 施旺细胞

施旺细胞形成髓鞘绝缘包裹周围神经系统的神经元轴突,对周围神经再生起重要作用,其异常引起周围神经性病变。2014 年 Thoma 等^[34]用具 AMPK、PKA、MSK1、SGK1、ROCK2 和 PKGα 众多靶点的多激酶抑制剂化合物 B 将成纤维细胞转化为短暂的神经前体阶段的细胞,然后又将其诱导为具电生理、髓鞘形成能力的功能性施旺细胞,为周围神经损伤的治疗带来新的细胞来源。

4 问题与展望

虽然成纤维细胞已成功被转化为各种神经细胞且在动物疾病模型中起到一定的效果,但是要用于临床还有很多问题,如转分化效率和移植后存活率低,能否与原有的神经细胞功能性地整合有待证实。即使人们已经成功实现了体内转分化,但提高转化的效率,找到安全有效的诱导基因材料以及转分化的机制有待深入研究。相信不久的将来转分化技术会极大地促进神经系统疾病的替代治疗和运用于临床。

参 考 文 献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463 (7284): 1035-1041.
- [2] 戴锐,孙晓阳,成纤维细胞向神经元转化的研究进展. *神经损伤与功能重建*, 2015, 10(1): 59-61.
- [3] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, 142(3): 375-386.
- [4] Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(3): 205-218.
- [5] Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzskova E, et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 2011, 476(7359): 224-227.
- [6] Yoo AS, Sun AX, Li L, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 2011. 476

- (7359) : p. 228-231.
- [7] Xue Y, Ouyang K, Huang J, et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell*, 2013,152(1-2) : 82-96.
 - [8] Zhou C, Gu H, Fan R, et al. MicroRNA 302/367 Cluster Effectively Facilitates Direct Reprogramming from Human Fibroblasts into Functional Neurons. *Stem Cells Dev*, 2015.
 - [9] Dai P, Harada Y, Takamatsu T. Highly efficient direct conversion of human fibroblasts to neuronal cells by chemical compounds. *J Clin Biochem Nutr*, 2015,56(3) : 166-170.
 - [10] Xu H, Wang Y, He Z, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to GABAergic neurons with combined medium without the introduction of transcription factors or miRNAs. *Cell Cycle*, 2015, 14(15) : 2451-260.
 - [11] Hu W, Qiu B, Guan W, et al. Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2) : 204-212.
 - [12] Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 2011, 476(7359) : 220-223.
 - [13] Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, et al Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(2) : 113-118.
 - [14] Pfisterer U, Kirkeby A, Torper O, et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011,108(25) : 10343-10348.
 - [15] Kim J, Su SC, Wang H, et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(5) : 413-419.
 - [16] Dell'Anno MT, Caiazzo M, Leo D, et al. Remote control of induced dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *J Clin Invest*, 2014, 124(7) : 3215-3229.
 - [17] Liu ML, Zang T, Zou Y, et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat Commun*, 2013, 4 : 2183.
 - [18] Blanchard JW, Eade KT, Szucs A, et al. Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons. *Nat Neurosci*, 2015,18(1) : 25-35.
 - [19] Victor MB, Richner M, Hermansteyn TO, et al. Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron*, 2014, 84(2) : 311-323.
 - [20] Kim J, Efe JA, Zhu S, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(19) : 7838-7843.
 - [21] Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012,109(7) : 2527-2532.
 - [22] Cheng L, Hu W, Qiu B et al. Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res*, 2014, 24(6) : 665-679.
 - [23] Lim MS, Chang MY, Kim SM, et al. Generation of Dopamine Neurons from Rodent Fibroblasts through the Expandable Neural Precursor Cell Stage. *J Biol Chem*, 2015, 290(28) : 17401-17414.
 - [24] Tian C, Li Y, Huang Y, et al. Selective Generation of Dopaminergic Precursors from Mouse Fibroblasts by Direct Lineage Conversion. *Sci Rep*, 2015, 5 : 12622.
 - [25] Zhou Q, Yan Q, Zhong J, et al. Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors. *J Biol Chem*, 2014,289(8) : 5250-5260.
 - [26] Huang Y, Tan S. Direct lineage conversion of astrocytes to induced neural stem cells or neurons. *Neurosci Bull*, 2015, 31(3) : 357-367.
 - [27] Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4) : 473-479.
 - [28] Kim SM, Flasskamp H, Hermann A, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts into induced neural stem cells. *Nat Protoc*, 2014,9(4) : 871-881.
 - [29] Molofsky AV, Kelley KW, Tsai HH, et al. Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature*, 2014, 509(7499) : 189-194.
 - [30] Proschel C, Stripay JL, Shih CH, et al. Delayed transplantation of precursor cell-derived astrocytes provides multiple benefits in a rat model of Parkinsons. *EMBO Mol Med*, 2014,6(4) : 504-518.
 - [31] Caiazzo M, Giannelli S, Valente P, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Reports*, 2015,4(1) : 25-36.
 - [32] Najm FJ, Lager AM, Zaremba A, et al. Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelino-genic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(5) : 426-433.
 - [33] Yang N, Zuchero JB, Ahlenius H, et al. Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat Biotechnol*, 2013,31(5) : 434-439.
 - [34] Thoma EC, Merkl C, Heckel T, et al. Chemical conversion of human fibroblasts into functional Schwann cells. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(4) : 539-547.