

• 综 述 •

诱导多能干细胞源性神经干细胞
用于治疗脑梗死的现状

刘爽 张卓伯

【中图分类号】 R743.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2018)03-0323-03
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.03.023

自诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)被发现以来它在神经系统疾病的应用越来越广泛。本研究通过查阅文献的方法对 iPSC 及其衍生物神经干细胞(neural stem cells NSC)移植治疗脑梗死的方法、结论进行概述,为干细胞移植治疗脑梗死提供理论依据。

脑梗死又称缺血性脑卒中(cerebral infarction),是指因脑组织局部血液循环障碍,缺血缺氧引起的神经功能障碍性疾病^[1]。神经细胞是一种永久细胞,一旦坏死后不可逆转,脑梗死的发生会导致神经功能的缺损甚至威胁生命。脑梗死在我国的发病率很高,约为 110/10 万人口,脑梗死患者的病死率较高、生活质量较差,对家庭和社会造成的负担较重。目前多采用药物或介入手术治疗,尚未发现任何一种治疗可以完全恢复神经系统的功能。近些年来科学发现人类胚胎干细胞移植是一项新颖而有潜力的治疗脑梗死的方法,已有动物实验表明移植入小鼠体内的胚胎干细胞具有多分化性,可以分化为神经细胞,并且具有高度的自我复制能力,替代死亡的神经细胞而发挥功能^[2]。但是,由于胚胎干细胞需要使用胚胎细胞,存在伦理道德争议,且异体移植会产生免疫排斥反应,所以研究受到了限制。2006 年诱导多能干细胞的发现解决了这一问题,日本 Yamanaka^[3] 研究小组利用 Oct3/4、Sox2、C-Myc 和 Klf4 4 种转录因子重新编码小鼠胚胎成纤维细胞,成功获得了生物特性与胚胎干细胞非常相似的细胞,称为诱导多能干细胞。

iPSC 相比于传统的细胞重编程手段具有极大的优势。(1)iPSC 受体细胞可来自体细胞,不需要使用卵母细胞或胚胎,可避免伦理及免疫排斥两大问题;(2)来源广泛。可以取自人 B 淋巴细胞^[4]、肝细胞、胃细胞^[5]、神经细胞^[6]等多种组织器官;(3)操作简单,具有重复性。取材可以来自患有特定疾病的患者,从而实现患者个体化。例如可以取来自于患神经退行性疾病患者的皮肤细胞,如肌萎缩侧索硬化症或帕金森氏病^[7],分化提取所需要的细胞类型,如运动神经元、多巴胺能神经元^[8],这使得人们在研究疾病发展的细胞和分子水平上达到了一个新高度;(4)增殖能力高。许多类型的细胞如神经细胞只能进行有限数量的增殖,而重新编程后得到的 iPSC 仍然是二倍体细胞。这让 iPSC 技术迅速取代了传统

的重编程手段,向临床应用更近一步。

1 iPSC 和 NSC 应用于治疗脑梗死

脑梗死与其他神经系统退行性疾病不同,脑缺血发生后血管内皮细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经元都在一定程度上发生了破坏和死亡,因此与帕金森病只需要一种细胞不同,治疗脑梗死需要细胞移植后分化的细胞种类更多,但是脑梗死是一次性的脑组织缺血损伤而非退行性改变,已经缺血坏死的脑组织不会再持续的退化,因此细胞移植治疗脑梗死不需要再进行基因修饰和重新编码。Jiang 等^[9] 在小鼠模型上初步完成了 iPSC 治疗脑梗死的实验,以评估治疗的效果及风险,虽然移植后小鼠的功能得到了改善,但发现大量的 iPSC 细胞经移植后死亡,只有少量细胞存活,且存在高致瘤性的问题。有报道称经颅内直接注射细胞较硬膜下腔注射的方法导致畸胎瘤的概率增高。有研究将纤维蛋白胶与 iPSC 混合后移植入脑梗死小鼠的硬膜下腔,观察到小鼠的功能改善,梗死面积缩小,且在 6 周后未发现肿瘤的形成,说明纤维蛋白胶可以一定程度上降低肿瘤发生的概率^[10]。

由于 iPSC 的较高致瘤性和较低存活率,将未分化的 iPSC 直接用于治疗脑梗死是不可行的,而移植后的 iPSC 需要先分化为神经干细胞(neural stem cells NSC),才能进一步分化成为神经元和神经胶质细胞,生理条件下人的脑组织侧脑室的脑室下层及海马齿状回粒内含有一定量的神经干细胞,这些细胞以胶质细胞的状态存在而不发挥功能,当神经细胞受到损伤时这些神经干细胞受到环境因素中某些信号因子的影响迁移、分化为神经元而发挥功能。移植的 NSC 具有弱免疫原性的特点,进行细胞移植后很少发生免疫排斥的现象。此外,NSC 的趋化性较强,由于微环境的作用,移植入体内后可向病灶处迁移、增殖、分化。因此,有研究将 iPSC-NSC 移植应用于治疗脑梗死^[11],目前已有多种方法可在体外成功地将 iPSCs 诱导为神经干细胞^[12-14]。有研究将人类 iPSC-NSC 移植到脑缺血大鼠的纹状体,并使用 MRI 追踪发现细胞经注射区域沿着胼胝体迁移至脑梗死区域,与宿主细胞发生整合,取代受损的细胞重建神经环路^[15]。此外,神经干细胞修复神经系统的损伤可能还有以下机制:(1)NSC 分化为多种类型的成熟神经元、星状细胞、少突胶质细胞,修复、替代梗死后缺损的神经细胞;(2)改变微环境,产生

营养因子,如成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor)、表皮生长因子(epidermal growth factor)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor)等促进损伤修复作用的营养因子^[16]; (3)减少了炎症反应的发生、抑制了胶质细胞的增生,且促进了室管膜下区内源性神经干细胞的增殖和迁移,整体提高了神经细胞的修复能力; (4)通过促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)和促血管生成素的生成,从而促进新生血管的形成,为神经功能的恢复提供充足的血供^[17]。实验证据表明无肿瘤细胞形成。Ok^[8]人将在体外获得的iPSC-NSC移植到脑梗死小鼠模型的纹状体,10周后发现移植的细胞存活率是10%。Ok^[8]等人在10只裸鼠身上再次重复这个试验,48h后进行神经干细胞的移植,4个月后发现细胞的存活率为50%,免疫荧光检测发现72%的细胞表达成熟神经元抗体,6%的细胞表达星形胶质细胞的抗体,2个月后2只小鼠死亡,8只存活,4个月后4只小鼠死亡,6只存活,所以移植后2个月的存活率为80%,4个月为60%;4个月后77%的细胞表达成熟神经元抗体,5%的细胞表达纹状体细胞的标志物—多巴胺能和cAMP相关的神经元磷蛋白(DARPP)-32,这个百分比与细胞直接移植到纹状体后,存活的机率大致相同。这一发现预示着进行移植的部位(例如皮层、纹状体)不影响细胞最终的存活,而在体外将iPSCs分化为神经干细胞再进行移植比直接使用iPSCs更能提高细胞的存活率。

目前iPSC的应用存在最大的问题就是在基因整合的过程中肿瘤的发生,目前导致iPSC成瘤的因素还未明确。Riggs等^[18]发现iPSCs与恶性肿瘤有部分细胞类型相同,在沉默基因与代谢活性方面存在某些共性,认为iPSC与癌细胞十分相似,肿瘤发生的原因可能就在于此。Park等^[19]认为使用病毒作为载体将体细胞转化为干细胞过程中会产生基因突变,导致肿瘤的发生。Mohammad等^[20]用无病毒载体和无外源基因的编程方法诱导出iPSC,再将这些细胞分化成为神经干细胞,并将这些细胞移植到脑梗死发生7d后的实验小鼠体内,通过移除黏附物能力测试,测试到小鼠恢复了感知功能,且脑源性神经营养因子也相应的增加,从而促进细胞的存活、生长及突触的形成,12个月后测试无肿瘤形成。为了去除iPSC中的致肿瘤基因,Liu等^[21]也使用相同的方法在缺氧的条件下仅使用2个因子将小鼠成纤维细胞转染为iPSC,并将其诱导为神经干细胞注入脑缺血小鼠模型,小鼠的神经功能缺损也得到了改善,且无肿瘤形成。Thier等^[22]使用最新的技术,成功地激活了Oct4将小鼠成纤维细胞转化为iPSC,这种方法与传统的iPSC技术相比生产速度提高了2~3倍,且细胞的致瘤性也得到了降低。有实验表明当移植宿主存在免疫缺陷时会增加致瘤的风险^[23]。

由于脑梗死的发病年龄老年化,因此Tatarishvili等^[24]在24个月龄的大鼠身上完成了细胞移植治疗脑梗死的实验,发现在神经干细胞移植8周后49%的细胞分化为成熟的 γ 氨基丁酸神经元,圆筒实验证明小鼠缺损的神经功能明显得到改善,且减少了小胶质细胞的激活。目前大多数已发表的实验都使用的是健康雄性鼠,将来还需要在雌性鼠及一

些合并其他疾病的鼠身上开展实验,如高血压病、糖尿病等,这些都是脑梗死的危险因素^[22]。

2 移植的时间窗和剂量

iPSC-NSC移植的重要问题之一就是脑梗死发生后细胞移植的时间,以往胚胎细胞移植的经验提示大脑中动脉闭塞致脑梗死发生后在第48h移植细胞的存活率最高^[25],Shear等^[26]认为脑梗死发生后第2~7d为神经干细胞移植的最佳时间,而非在这个时间点之前移植可能与急性期局部脑组织坏死、细胞释放的炎症介质增高有关,且急性期的神经营养因子较少,不利于细胞的生长,但是在脑梗死发生后第48h这一时间点移植在临床实施上比较困难,制备一定量的iPSC至少需要4周,再将其诱导为需要的神经干细胞又需要几周,而将这些细胞应用于临床前还需要经过一系列的实验,确保其安全性。因此,以现在的制备技术达到时间窗的要求还十分的困难。

目前就脑梗死细胞移植剂量的数据统计还十分匮乏,大部分的数据主要来自鼠胚胎神经干细胞的实验,Darsila等^[27]分别将 3×10^5 、 7.5×10^5 和 15×10^5 数量的神经干细胞移植到脑梗死小鼠模型的脑内,结果显示当移植细胞数超过 3×10^5 的时候,细胞的存活率将不再随着细胞数的增加而增加,提示 3×10^5 数量的神经干细胞可以以最小的数目发挥较好的治疗效果。Wang等^[28]认为 8×10^5 数量的神经干细胞治疗脑梗死的Wistar大鼠为最佳数目。此项实验还没有在与人脑体积和构造相似的大型动物身上实践过,所以应用人体的细胞数量可否依据这些实验的细胞数据成比例计算还不明确。

3 展望

目前对iPSC的定向诱导和神经干细胞的移植治疗脑梗死实验研究已有很多,但还都停留在探索阶段,以iPSC为基础的细胞疗法在治疗脑梗死方面存在着巨大的潜力,但还有很多问题亟待明确,如iPSC的致瘤性、神经干细胞移植的数量、时间、部位(缺血半暗带内还是梗死区域)。为了保证iPSC和NSC的质量和减少制备时间,将来需要建立统一来源的iPSC细胞储备库,提供优质来源细胞,增加移植后的安全系数,使细胞移植治疗脑梗死应用于临床早日实现。

参 考 文 献

- [1] 侯书敏,张东,党国义. 脑梗死临床治疗研究进展[J]. 河北医学, 2012, 18(12): 1799-1801.
- [2] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(32): 11839-11844.
- [3] 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.
- [4] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to plu-

- riipotency[J]. *Cell*, 2008, 133(2): 250-264.
- [5] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells[J]. *Science*, 2008, 321(5889): 699-702.
 - [6] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. *Cell*, 2009, 136(3): 411-419.
 - [7] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons[J]. *Science*, 2008, 321(5893): 1218-1221.
 - [8] Oki K, Tatarishvili J, Wood J, et al. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(6): 1120-1133.
 - [9] Jiang M, Lv L, Ji H, et al. Induction of pluripotent stem cells transplantation therapy for ischemic stroke[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354(1/2): 67-75.
 - [10] Chen SJ, Chang CM, Tsai SK, et al. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue[J]. *Stem Cells Dev*, 2010, 19(11): 1757-1767.
 - [11] Chang DJ, Lee N, Park IH, et al. Therapeutic potential of human induced pluripotent stem cells in experimental stroke[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(8): 1427-1440.
 - [12] Hoveizi E, Ebrahimi-Barough S, Tavakol S, et al. In vitro differentiation of human iPS cells into neural like cells on a biomimetic polyurea[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1): 601-607.
 - [13] Su H, Wang L, Huang W, et al. Immediate expression of Cdh2 is essential for efficient neural differentiation of mouse induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 338-348.
 - [14] Stover AE, Brick DJ, Nethercott HE, et al. Process-based expansion and neural differentiation of human pluripotent stem cells for transplantation and disease modeling[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(10): 1247-1262.
 - [15] Mochizuki N, Moriyama Y, Takagi N, et al. Intravenous injection of neural progenitor cells improves cerebral ischemia-induced learning dysfunction[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(2): 260-265.
 - [16] Waschek JA. Noggin on heaven's door: a factor that promotes the selective production of serotonergic neurons from murine embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells[J]. *J Neurochem*, 2012, 122(1): 1-3.
 - [17] Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, et al. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI[J]. *Neuroimage*, 2005, 28(3): 698-707.
 - [18] Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, et al. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(1): 37-50.
 - [19] Park TS, Huo JS, Peters A, et al. Growth factor-activated stem cell circuits and stromal signals cooperatively accelerate non-integrated iPSC reprogramming of human myeloid progenitors[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42838.
 - [20] Mohamad O, Drury-Stewart D, Song M, et al. Vector-free and transgene-free human iPS cells differentiate into functional neurons and enhance functional recovery after ischemic stroke in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64160.
 - [21] Liu SP, Fu RH, Wu DC, et al. Mouse-induced pluripotent stem cells generated under hypoxic conditions in the absence of viral infection and oncogenic factors and used for ischemic stroke therapy[J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(4): 421-433.
 - [22] Thier M, Wrsd rfer P, Lakes YB, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(4): 473-479.
 - [23] Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells[J]. *Circulation*, 2009, 120(5): 408-416.
 - [24] Tatarishvili J, Oki K, Monni E, et al. Human induced pluripotent stem cells improve recovery in stroke-injured aged rats[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2014, 32(4): 547-558.
 - [25] Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations[J]. *Stroke*, 2009, 40(6): 2244-2250.
 - [26] Shear DA, Tate CC, Tate MC, et al. Stem cell survival and functional outcome after traumatic brain injury is dependent on transplant timing and location[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2011, 29(4): 215-225.
 - [27] Darsalia V, Allison SJ, Cusulin C, et al. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(1): 235-242.
 - [28] Wang L, Cui WY, Wang XP, et al. Different quantities of neural stem cells transplantation in treating experimental cerebral infarction[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, 16(1): 90-94.

(2017-11-03 收稿)