

诱导多能干细胞治疗脊髓损伤的现状与展望^{*}

孟纯阳

(济宁医学院附属医院, 山东 济宁 272029)

摘要 脊髓损伤主要是由外伤、脊髓疾病以及医源性损伤等因素引发, 往往导致脊髓局部缺血受损从而引起相应支配区域肢体的感觉和运动功能丧失。脊髓损伤的修复和治疗一直是世界研究的热点和难点。尽管目前医疗技术和手术方法较前显著提高, 但现有的治疗脊髓损伤的方法和疗效依然与临床需求相差甚远。由于脊髓损伤常可导致病人不同程度的神经功能受损而出现全瘫或不完全瘫痪, 给个人、家庭和国家带来了巨大经济和社会负担, 因此亟需开发出新疗法以提高脊髓损伤的治疗效果。近年来干细胞研究的迅猛发展使得干细胞应用于脊髓损伤治疗成为可能, 干细胞治疗作为脊髓损伤的一个重要有前途的领域也已被提出并付诸实践, 最近一些干细胞治疗的临床试验不仅启动, 也在不同国度进行了报道, 并引起了全球广泛关注。本文总结了脊髓损伤治疗的现状, 介绍诱导多能干细胞的来源以及生物学特性, 探讨诱导多能干细胞的分化潜能以及诱导多能干细胞应用于脊髓损伤治疗的展望。

关键词 脊髓损伤; 诱导多能干细胞; 细胞治疗

中图分类号: R744.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2013)06-153-04

Present state and perspectives of treatment of spinal cord injury with induced pluripotent stem cells

MENG Chun-yang

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272029, China)

Abstract: Spinal cord injury is mainly due to various injuries such as trauma, ischemia, and iatrogenic injury, which usually leads to loss of sensory and motor function of the limbs of patients. Although medical technology and surgical methods have improved, the treatment of spinal cord injury is still limited. Since it could result in varying degrees of permanent loss of neurological function and disability of patients and it is a great burden for both families and the society, it is necessary to find a new strategy to treat spinal cord injury. The rapid development of research on stem cells makes it possible to treat spinal cord injury with stem cells. Recent clinical trials of stem cell therapy for spinal cord injury have been reported and attracted wide attention in the whole world. In this article, the development of the treatment of spinal cord injury has been summarized; the sources and biological characteristics of induced pluripotent stem cells have been introduced; the outlook of differentiation potential of pluripotent stem cells and its application for treatment of spinal cord injury have been made.

Key words: Spinal cord injury; Induced pluripotent stem cell; Cell therapy

脊髓损伤是临床上较为常见的一种创伤性疾病, 由于现有治疗方法效果不理想, 常可引起病人不同程度的神经功能的丧失甚至残疾^[1]。脊髓损伤的发病机理是一个非常复杂的过程, 包括最初的机械损伤, 然后是一系列的细胞和分子反应组成的二次损伤包括谷氨酸细胞毒性, 自由基生成, 脂质

过氧化, 炎症反应以及缺血等并最终导致坏死和凋亡。根据这些病理发生过程, 已经提出了几种治疗脊髓损伤的方法: 1) 使细胞死亡的进程最小化; 2) 通过移植或者刺激受损的脊髓产生新的细胞以替代丢失的细胞称为神经再生; 3) 重新将受损的神经纤维和原来的目标器官相连; 4) 通过改变连接性, 使旁路的功能最大化; 5) 通过修复髓鞘使多余的神

^{*} [基金项目] 山东省高等学校科技计划资助项目(编号 J11LF19)

经纤维功能最大化;6)使肌肉功能康复;7)使用假体或者机器人以及其它技术恢复功能。近年来,干细胞研究快速发展,在不远的将来干细胞有可能应用于脊髓损伤治疗中的几种或者全部的策略中^[2]。

1 脊髓损伤治疗的病理机制和治疗现状

脊髓损伤包括急性损伤和二次损伤,前者是由直接的机械伤害造成的不可逆损伤,后者是包括炎症免疫反应、细胞坏死和凋亡、细胞毒性、细胞内外离子不平衡、氧自由基、脂质过氧化以及轴索反应^[3]。在脊髓损伤的早期阶段,脊髓肿胀淤血,随后脊髓局部缺血并导致损伤区域坏死。在早期的急性损伤期主要特征是炎症反应,自由基的产生,电解质失衡,免疫相关的神经毒性以及一些反应,因此在此期间神经保护干预非常重要。亚急性期的主要特征是细胞吞噬,大量的神经细胞和组织碎片被吞噬,产生有利于轴突再生以及其它反应的微环境,这个时期是干细胞移植的最好时期。亚急性期的最明显特征是胶质疤痕的形成以及轴突疤痕的形成。最后,在慢性期脊髓空洞或者痿管的形成标志着脊髓损伤进入稳定期^[4]。

脊髓损伤修复的困难主要是神经细胞和神经胶质细胞坏死凋亡,临近但未凋亡的细胞由于自身有限的再生能力不能有效的产生新的细胞。另一方面,局部微环境的改变导致神经胶质细胞增殖不平衡,例如产生形成轴突髓鞘的少突神经胶质细胞增殖缺陷,星形胶质细胞和小胶质细胞的增生阻止了轴突的再生、轴突连接的建立以及功能的恢复^[5]。

脊髓损伤的治疗包括手术、药物治疗以及生物治疗。在脊髓损伤早期,手术减压以及脊柱稳定性重建,对急性脊髓受压的患者是有效改善脊髓损伤治疗方法^[6]。目前临床常用的用于治疗脊髓损伤的药物多处于临床试验阶段,这些药物可以在脊髓损伤的急性期有效减少脊髓损伤的二次伤害,保护残存的神经组织。但迄今为止,药物和手术治疗并没有得到满意的结果,因为损伤的神经细胞和轴突具有不可再生性,突触连接很难重新建立^[7]。

随着生物技术的发展,细胞移植作为生物治疗的新方法为脊髓损伤的治疗提供了新的希望。人脐带血细胞无免疫原性,在脊髓损伤治疗方面具有一定的潜力,安全、可行并且有效。但是对于脐带血细胞的临床研究比较少。最近,利用脂肪来源的

干细胞和骨髓间充质干细胞可以有效地解决细胞来源以及伦理等问题,但是这些细胞均一性比较差,需要新的技术以提高纯度并扩增^[8]。然而,诱导多能干细胞具有其它细胞不具有的特性,例如多向分化潜能,来源广泛,取样简单,无宿主免疫反应以及无伦理与法律问题。

2 诱导多能干细胞生物学特性

探求具有胚胎干细胞多向分化能力,并且具有患者个体化的种子细胞一直是再生医学的主要目标之一。诱导多能干细胞由成体细胞去分化产生,具有多向分化能力,成体细胞来源于患者。诱导多能干细胞来源于不同的细胞,通过重编码技术使细胞表达几个特异的转录因子。第一批诱导多能单细胞是通过逆转录病毒将 Oct3/4, Sox2, Klf4 和 c-Myc 基因输送到小鼠的成纤维细胞中产生的^[9]。现在可以通过一系列的方法产生诱导多能干细胞:1)病毒转染:诱导多能干细胞可以通过利用不同类型的病毒向细胞中转入不同类型或者不同量的转录因子而产生。但是这些外源性的基因倾向于整合到宿主基因组中,提高了成瘤的风险性^[10]。2)质粒转染:虽然质粒转染也有可能整合到基因组中,但是可能性要比逆转录病毒小的多,所以质粒转染相对更安全^[11]。3)游离性载体:利用游离性载体将转录因子转染进入成人细胞,转染后载体被清除,因此阻止了外源基因的整合^[12]。4)易位系统:转录因子通过异位系统进入细胞,当诱导多能干细胞通过重编程产生后,转座子被移位酶清除,因此诱导多能干细胞没有外源基因的插入^[13]。5)重组蛋白:成体细胞可以通过转录因子所编码的蛋白发展成为诱导多能干细胞。这种方法比病毒和质粒介导的基因转运更安全,但是效率会降低^[14]。6)化学方法:几个实验团队通过化学物质和转录因子成功地获得了诱导多能干细胞^[15]。7)RNA:诱导多能干细胞可以利用 miRNA 诱导产生^[16]。这种方法避免了转染编码以上所提到的转录因子的基因,是一种安全有效的产生诱导多能干细胞的方法。但是产生率依然很低。我们希望通过不断的革新诱导方法,能够在不久的将来可以高效安全的产生诱导多能干细胞。

多向分化能力是诱导多能干细胞的主要特点,诱导多能干细胞能够分化成 3 个胚层以及各种不同的细胞。最初的研究表明诱导多能干细胞和胚

胎干细胞有许多相同之处,例如形态,增殖,表达胚胎干细胞标志基因,畸胎瘤形成。诱导多能干细胞来源于接受者,可以避免胚胎干细胞在临床应用中所产生的伦理和法律问题。同时,诱导多能干细胞来源广泛,量大,容易获取。

3 诱导多能干细胞和脊髓损伤治疗

小鼠胚胎成纤维细胞诱导多能干细胞在体外可以产生具有功能的神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。不同成体组织来源的诱导多能干细胞对神经诱导信号的反应性以及成瘤性各不相同。在组织挫伤的第九天将神经球移植到脊髓可以分化成 3 种神经细胞系,没有产生畸胎瘤,并且参与了髓鞘再生。诱导多能干细胞移植治疗脊髓损伤的机制主要是:移植细胞重建神经突出连接,少突触细胞使脱髓鞘轴突再生髓鞘,移植细胞产生神经生长因子。将人源诱导多能干细胞产生的神经球移植到联合免疫缺陷小鼠中,移植的神经球在损伤的脊髓中存活,迁移分化成 3 种主要的神经细胞系。同时观察到细胞自发的以及非细胞自发的效应,包括诱导多能干细胞来源的神经细胞与小鼠自身神经突触连接的建立,神经营养因子的表达,血管的生成,轴突的再生以及受损区域髓磷脂的再生。2008 年哈佛大学的 Dimos 等^[17]通过对一位患有家族性脊髓侧索硬化症的患者成纤维细胞进行诱导,成功地获得了诱导多能干细胞并进一步将其诱导分化成运动神经元,而运动神经元是脊髓损伤时被破坏的细胞种类之一。Tsujii 等^[18]将人源诱导多能干细胞分化产生的神经上皮样细胞移植到联合免疫缺陷小鼠受损的脊髓中,细胞存活并且分化为神经细胞,促进了小鼠后肢的功能恢复。该结果表明诱导多能干细胞移植可以提高甚至恢复脊髓损伤小鼠的功能。将诱导多能干细胞分化形成的神经球在脊髓损伤的第九天的亚急性期移植到联合免疫缺陷小鼠的体内。研究表明神经球分化为神经元(31.4±1.1)%,星形胶质细胞(49.3±4.5)%,少突细胞(14.4±3.0)%,表明几乎所有的诱导多能干细胞来源的神经球都分化为了神经细胞。在受损的脊髓中发生严重神经营养因子改变,髓鞘脱失,但是当移植神经球后状况得到明显改善。同时在 42d 后观察发现有髓鞘区神经球移植与对照组分别为(0.19±0.029)mm²和(0.046±0.012)mm²。

4 诱导多能干细胞应用于脊髓损伤治疗存在的问题

虽然诱导多能干细胞在治疗脊髓损伤方面表现出了许多突出的优点,但是推动其在脊髓损伤临床应用方面的应用,尚有许多问题需要解决:1)提高获得诱导多能干细胞的效率。目前获得诱导多能干细胞的效率依然很低,而较低的获取效率无疑会阻碍诱导多能干细胞的临床应用。2)诱导多能干细胞的来源,来源于不同组织的诱导多能干细胞效率以及安全性不完全相同。因此选择合适的细胞来源比较重要。3)诱导多能干细胞引起的免疫反应^[19]。起初广泛认为诱导多能干细胞没有免疫排斥反应,但是进一步的研究表明诱导多能干细胞具有免疫原性。4)诱导多能干细胞的安全性。众所周知如果移植没有分化的诱导多能干细胞可能引起畸胎瘤的形成。虽然流式细胞术可以分选出分化与未分化的诱导多能干细胞,从而阻止移植后畸胎瘤的形成,但是此种方法不能满足临床上对大量诱导多能干细胞的需求。DNA 甲基化和表型分析发现诱导多能干细胞和胚胎干细胞存在一定的差别。病毒介导的基因输送具有外源基因整合的风险。5)诱导多能干细胞应用于临床脊髓损伤治疗。至今还没有研究显示究竟多少数量的诱导多能干细胞用于移植可以达到较好的效果,太多或者太少的移植都可能导致移植的失败。干细胞移植治疗后形成的不正常的连接有可能会引起痛觉过敏。诱导多能干细胞的移植治疗方法仍有待进一步研究。

5 诱导多能干细胞应用于脊髓损伤治疗的展望

胚胎干细胞已经被 FDA 批准用于脊髓损伤治疗的一期临床试验^[20]。与胚胎干细胞相比诱导多能干细胞具有很多优势,在不久的将来诱导多能干细胞可能应用于脊髓损伤的临床治疗。最近的研究表明成纤维细胞可以经过重编码直接成为神经细胞和肝细胞,也就意味着诱导多能干细胞的中间态被省略^[20]。诱导多能干细胞应用于脊髓损伤的治疗方式可能被改变,成体干细胞通过诱导直接分化为神经细胞和胶质细胞,从而避免诱导多能干细胞癌变的风险^[22-24]。虽然这种方法的转化效率比较低,但它无疑为干细胞移植用于脊髓损伤的治疗提供了突破口^[25-27]。运用确定的因子将小鼠和人的成纤维细胞直接转化为运动神经元,能够在体内分化成具有功能的神经细胞。虽然直接重编程

技术为脊髓损伤治疗提供了新的治疗方法,进一步优化大规模准备临床级和个体特异性可移植的诱导多能干细胞的方法仍然很有前景。

参考文献:

- [1] Mothe AJ, Tator CH. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(11):3824-3834.
- [2] Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 235(1):78-90.
- [3] Koizumi S, Gu C, Amano S, et al. Migration of mouse-induced pluripotent stem cells to glioma-conditioned medium is mediated by tumor-associated specific growth factors[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(2):283-288.
- [4] Li J, Lepski G. Cell transplantation for spinal cord injury: a systematic review[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:786475.
- [5] Nakamura M, Okano H. Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Res*, 2013, 23(1):70-80.
- [6] Fehlings MG, Perrin RG. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(11 Suppl):S28-35.
- [7] Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, et al. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury[J]. *Spine J*, 2004, 14(4):451-464.
- [8] Lee JH, Chung WH, Kang EH, et al. Schwann cell-like remyelination following transplantation of human umbilical cord blood(hUCB)-derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury[J]. *J Neurol Sci*, 2011, 300(1-2):86-96.
- [9] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4):6636-6676.
- [10] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007, 318(5858):1917-1920.
- [11] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903):949-953.
- [12] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences[J]. *Science*, 2009, 324(5928):797-801.
- [13] Nagy K, Sung HK, Zhang P, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts[J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(3):693-702.
- [14] 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.
- [15] Shi Y, Do JT, Desponts C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6):525-528.
- [16] Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state[J]. *RNA*, 2008, 14(10):2115-2124.
- [17] 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.
- [18] Tsuji O, Miura K, Fujiyoshi K, et al. Cell therapy for spinal cord injury by neural stem/progenitor cells derived from iPS/ES cells[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8:668-676.
- [19] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2011, 474(7350):212-215.
- [20] Alper J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product[J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27(3):213-214.
- [21] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors[J]. *Nature*, 2010, 463(7284):1035-1041.
- [22] Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(40):16825-16830.
- [23] Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(19):4694-4705.
- [24] Dolgin E. Flaw in induced-stem-cell model[J]. *Nature*, 2011, 470(7332):13.
- [25] Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors[J]. *Nature*, 2011, 476(7359):220-223.
- [26] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors[J]. *Nature*, 2011, 475(7356):386-389.
- [27] Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(3):205-218.

(收稿日期 2013-05-15)