

获得组织再生需要细胞类型的多种途径

李美蓉 韩为东 付小兵

创伤与一些慢性疾病均可导致组织器官的功能障碍,组织再生存在极大的社会需求^[1-4]。组织再生的核心问题是如何获取充足的目的细胞。基于现实的研究基础,从获得的策略上讲,可以分为3个层面:①具有多向分化能力的干细胞分化为特定组织细胞类型;②诱导已分化细胞发生去分化,使其再次进入细胞周期,满足组织再生的需求;③使机体易于获得、扩增的细胞重编程为目的细胞类型。该综述将从这3个层面进行逐一的论述,并深入探讨各种策略尚待完善的问题及应对措施。

一、干细胞分化为特定组织类型的细胞

干细胞按照分化能力分为两个层次:全能细胞具有分化为机体所有组织类型细胞的能力,如胚胎干细胞(ESCs);多能细胞在特定环境下能够多系列分化,如成体干细胞。基于ESCs全能性的特点,ESCs始终被认为是再生医学的焦点,但是ESCs作为再生医学的种子细胞具有潜在的隐患。直接移植ESCs,其在体内往往分化不全,导致高的畸胎瘤形成率。因此,研究者们转而采用体外ESCs直接分化获得的特定组织类型细胞作为种子细胞来进行移植。动物水平研究显示ESCs诱导获得的组织细胞可以用于疾病的治疗,如脊髓横断性疾病等^[4]。但ESCs的应用仍然涉及伦理问题、免疫排斥、分化效率等问题。因此,目前ESCs只能作为一种研究的工具。

2006年,日本Yamanaka通过转基因的方法将终末分化的成纤维细胞重编程为诱导的多潜能干细胞(iPSCs),该类细胞在分化潜能、基因表达谱系与表观遗传标记特征方面与ESCs及其相似^[5,6]。同时我国科学家周琪等证实体细胞起源的iPSCs可以发育成独立的个体,充分证明iPSCs具有与ESCs几乎一样的全能性。另外,iPSCs既不涉及胚胎毁损问题,也不涉及免疫排斥问题,为个体特异的疾病治疗与组织再生带来希望,所以自iPSCs问世以来就备受科学界的关注,但由于病毒介导的转基因以及癌基因的细胞导

入,存在致瘤风险。因此,iPSCs的临床应用还很遥远。实质上,体细胞重编程为iPSCs是一个细胞去分化的过程,但是在整个过程中我们关注的是最终产生的iPSCs细胞。但是这种去分化的手段及其中的转变机制是值得深入探讨的,并为细胞的去分化提供宝贵的信息。

那么我们如何能够获得避免上述问题的iPSCs细胞呢?非转基因重编程即不通过转基因的方式,而着重在细胞诱导微环境的策略将细胞重编程为iPSCs细胞逐渐受到关注。2009年,内布拉斯加州医学中心的Balasubramanian等^[7]曾在《Stem Cells》杂志发表论文,该文报道了他们利用小鼠ESCs的培养条件,将大鼠角膜缘上皮细胞驯化为iPSCs样细胞,并证实这一来源的细胞具有多潜能分化的特征,可以分化为功能性神经细胞、心肌细胞以及肝细胞,并证实这样来源的iPSCs样细胞象ESCs一样,体内接种可以导致畸胎瘤的发生。尽管目前尚没有证明这样来源的iPSCs能否像转基因来源的iPSCs一样,可以发育成一个独立的个体,这一研究结果足以提示优化的培养环境是可以将成体细胞去分化重编程为iPSCs细胞。然而,iPSCs的重编程的效率极低,提示只有很少数的起始细胞可以去分化重编程为iPSCs细胞,那么具有什么样特征的期初细胞可以最终演变为iPSCs细胞呢?对于这一问题,Yamanaka等^[8]科学家曾提出过“精英细胞学术”与“随机学术”,前者是指某一群体细胞中存在一些具有某种特质的细胞,能够发生重编程的细胞只能是这些细胞,而后者则指一个细胞群中随机的某些细胞在导入转录因子后可发生去分化重编程。尽管目前关于非转基因途径制造iPSCs的研究还处于不成熟,该路径是今后iPSCs研究领域的一个重要方向,也是实现非转基因iPSCs走向临床的必由之路。

成体干细胞较胚胎干细胞的分化能力有限,其在体外通过培养微环境模拟能够转分化为多种组织类型,如间充质干细胞(MSCs)、脂肪干细胞、毛囊干细胞、表皮干细胞等^[9]。另外,体内的证据显示MSCs

等输入患者体内,利用其多潜能分化特征、营养作用、内分泌与旁分泌特征,以及免疫调节效应进行组织再生与疾病治疗。目前,利用 MSCs 成体干细胞进行组织再生与疾病治疗已经进入了较大规模的临床试验阶段,并已取得较大程度的进展,涉及的疾病约 40 余种^[10-12]。除此之外,其他的成体干细胞,如脂肪干细胞、真皮来源的干细胞在损伤性动物模型上均收到良好的治疗效果。因此,成体干细胞也是临床治疗的备选种子细胞。尽管如此,如何获得移植所需的大量的种子细胞,如何评定分化后细胞的功能及安全性,尚缺乏统一的操作规范,这些都是实现成体干细胞进行大规模临床治疗之前需要阐明的问题。

二、诱导已分化细胞发生去分化

去分化是指已经分化的细胞在特定因素的作用下,重新进入增殖周期,获得增生及分化的能力。是指分化细胞失去特有的结构和功能变为具有未分化细胞特性的过程。多种非哺乳动物通过去分化的方式完成组织缺损后的再生^[13]。众所周知,高等哺乳动物的心肌组织以及神经组织是不能再生的,如果可以通过某一手段将其去分化再次获得增殖能力,那么对一些心肌缺血性疾病以及神经损伤性疾病的治疗将具有极大的推动作用。从这一意义上讲,寻找这些不能再生组织细胞的去分化途径显得颇为重要。

早在 2001 年,付小兵等就在慢性创面的表皮组织中发现了已分化的表皮细胞存在去分化的现象,之后这种去分化现象也被不同的学者在创伤修复中的肾以及肺组织中报道^[14]。提示已分化细胞的去分化可能是实现组织再生的一种途径。但是,值得注意的是,机体自身去分化的力度是微弱的,特别是创伤修复过程中去分化可能是哺乳动物个别组织类型所特有的。因此,依靠组织自身去分化完成组织再生几乎不可能。那么我们是否可以有意识地通过促使细胞去分化,使其再次进入细胞周期,再次增殖,实现某些组织的再生呢?如果可以,这一思路将对某些难以再生或不能再生的组织获得完美修复非常有意义。

2004 年,Allan Spradling 和 Toshie Kai 在 Nature 上首次报道了体内成功诱导体细胞去分化为干细胞的案例^[15]。遭受热休克打击的幼虫成熟后,实验者导入 Bam 基因,促使干细胞开始分化。但是它们的功能尤其是生育功能仍然正常。这就说明了打击后观察到的干细胞是来源于去分化的细胞。这些去分化的机制是值得我们借鉴的。另外上述提到的重编程的实验研究中,多个研究显示抑制 p53 的表达可以

有效的增加体细胞的重编程率,提示控制某些抑癌基因的表达可能促使已分化细胞发生去分化^[16-18]。近期,发表在《Stem Cell》上的一篇论文颇有新意,Pajcini 等将肌肉细胞中抑癌基因 Rb 与 ARF 抑制后,发现哺乳动物肌肉细胞可以进入细胞周期,并获得部分增殖能力^[19]。这一研究结果给我们如下启示:通过抑制某些抑癌基因可能促使某些组织类型的细胞,如心肌细胞、神经细胞发生去分化,进而增殖,最终可能促进这些组织的再生。因此,通过我们不断的研究,借鉴其他生物去分化的相关机制,在实现受损组织细胞体外去分化的基础上,最终实现受损组织细胞的体内的去分化,是实现组织再生的最佳途径。

三、自体易扩增细胞重编程为种子细胞类型

将某一种细胞通过某种手段重编程为另外一种细胞类型是获得组织再生需要细胞类型的另外一条令人关注的途径,同时也是今后几年研究的一个热点。该种策略能够实现细胞的横向分化。其实,早在 1990 年,Choi 等就发现外源表达 MyoD 转录因子可以将成纤维母细胞、软骨细胞以及视网膜上皮细胞转变成成为可以收缩的肌细胞。2004 年,Xie 等发现 CEP/B 可将 B 淋巴细胞重编程为巨噬细胞。2005 年,Izumikawa 等发现 Math1 可以将内耳支持细胞重编程为感觉毛细胞。近期,Zhou 等发现将 Ngn3、Pdx-1 以及 Mafa 转录因子导入到胰腺外分泌细胞,可以将其在体内重编程为胰岛素分泌细胞^[20]。之后,Vierbuchen 与 Ieda 等分别发表了 Ascl1/Brn2/Myt1 或 Gata4/Mef2c/Tbx5 将成纤维母细胞重编程为功能性神经元或心肌细胞的研究报告^[21,22]。这些关于系列重编程的研究均具有较 iPSCs 重编程高的效率,但提示在发育上较近的细胞类型之间诱导系列重编程较为容易。当然,与 iPSCs 重编程相似,转基因途径并不是实现细胞横向分化的唯一途径。近期研究还发现,将某种类型的细胞接种到特定的体内环境下可能将其重编程为环境特有的细胞类型。如 Bonfanti 等在 Nature 撰文发现,将发育中的小鼠胸腺上皮细胞在体外驯化培养一段时间后接种到皮下可以重编程为毛囊干细胞^[23]。这些研究成果不仅为组织发育,细胞分化、转分化提供起决定性作用的因子,也为再生医学种子细胞的来源提供更广泛的实现方法。

综上所述,我们可以利用多种策略获得我们所需要的种子细胞,并且每种方法获得的种子细胞存在其自身的优点。但是就种子细胞本身而言,它应该满足两方面的要求:首先,种子细胞的数量满足细胞治疗

所需;其次,种子细胞的细胞生物学及功能上应与目的细胞相匹配。通过上述的策略我们能够满足种子细胞量的要求,但是目前通过上述策略来源的种子细胞尚缺乏统一的评定标准及各种方法来源的同一种种子细胞的优势对比,所以我们今后的工作还要在这些方面深入研究。

参考文献

- Lopez - Novoa JM, Rodriguez - Pena AB, Ortiz A, *et al.* Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies; clinical implications. *J Transl Med*, 2011, 9(1) : 13
- McCullough PA, Ahmad A. Cardiorenal syndromes. *World J Cardiol*, 2011, 3(1) : 1 - 9
- Wong F. Renal diseases and the liver. *Clin Liver Dis*, 2011, 15(1) : 39 - 53
- Marques SA, Almeida FM, Fernandes AM, *et al.* Predifferentiated embryonic stem cells promote functional recovery after spinal cord compressive injury. *Brain Res*, 2010, 1349(19) : 115 - 128
- 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
- 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
- Balasubramanian S, Babai N, Chaudhuri A, *et al.* Non cell - autonomous reprogramming of adult ocular progenitors; generation of pluripotent stem cells without exogenous transcription factors. *Stem Cells*, 2009, 27(12) : 3053 - 3062
- Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*, 2009, 460(7251) : 49 - 52
- Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells*, 2011, 29(1) : 5 - 10
- García - Gómez I, Elvira G, Zapata AG, *et al.* Mesenchymal stem cells; biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*, 2010, 10(10) : 1453 - 1468
- Boncoraglio GB, Bersano A, Candelise L, *et al.* Stem cell transplantation for ischemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010, 8(9) : CD007231
- Matthay MA, Thompson BT, Read EJ, *et al.* Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest*, 2010, 138(4) : 965 - 972
- Tsonis PA. Stem cells from differentiated cells. *Mol Interv*, 2004, 4(2) : 81 - 83
- Fu X, Sun X, Li X, *et al.* Dedifferentiation of epidermal cells to stem cells in vivo. *Lancet*, 2001, 358(9287) : 1067 - 1068
- Kai T, Spradling A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature*, 2004, 428(1) : 564 - 569
- Menendez S, Camus S, Izpisua Belmonte JC. p53: guardian of reprogramming. *Cell Cycle*, 2010, 9(1) : 3887 - 3891
- Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53 - p21 pathway. *Nature*, 2009, 460(27) : 1132 - 1135
- Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 2009, 460(27) : 1140 - 1144
- Pajcini KV, Corbel SY, Sage J, *et al.* Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(2) : 198 - 213
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, *et al.* In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta - cells. *Nature*, 2008, 455(2) : 627 - 632
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463(25) : 1035 - 1041
- 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
- Bonfanti P, Claudinot S, Amici AW, *et al.* Microenvironmental reprogramming of thymic epithelial cells to skin multipotent stem cells. *Nature*, 2010, 466(19) : 978 - 982 (收稿: 2011 - 03 - 10)

2006 ~ 2009 年《医学研究杂志》各项评价指标分析

根据中国科学技术信息研究所发布的《2010 年中国科技期刊引证报告》,《医学研究杂志》所有指标排名均处于中上或中等水平,各项指标之间排名比较均衡,其中基金论文比优势明显,大约处于期刊总数前 10% 的位置,显示了期刊对于刊登高水平学术论文的重视。根据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》显示:在 2006 ~ 2009 年 4 年间《医学研究杂志》的学科影响因子分别为:0.046、0.216、0.374、0.407;总被引频次为:210、429、712 及 1008;基金论文比分别为:0.177、0.308、0.306 及 0.305;他引率分别为 96%、96%、98% 及 98%;各项指标均稳步提高,特别是他引率一直保持在 95% 以上,更能客观地证明《医学研究杂志》在国内医药卫生领域中很好地发挥了信息交流媒介作用。

在《2010 年中国科技期刊引证报告(核心版)》中,《医学研究杂志》在 1946 种核心期刊中,总被引频次、影响因子及综合评价分别排第 1079、1465 和 1236 位。在 47 种医学综合类核心期刊中,《医学研究杂志》总被引频次、影响因子及综合评价分别排 38、29 和 18 位。