

干细胞专题

干细胞研究进展消息

干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源,具有高度自我复制、高度增殖和多向分化的潜能。干细胞研究正在向现代生命科学和医学的各个领域交叉渗透,干细胞技术也从一种实验室概念逐渐转变成能够看得见的现实。干细胞研究已成为生命科学中的热点。鉴于此,本刊就干细胞的最新研究进展情况设立专栏,为广大读者提供了解干细胞研究的平台。

Cell Stem Cell: 利用单个转录因子将皮肤细胞直接重编程为多能神经嵴

美国Johns Hopkins大学医学院的科学家通过直接重编程,将皮肤细胞转变成了诱导神经嵴(induced neural crest, iNC),并用家族性自主神经功能障碍(familial dysautonomia, FD)患者的皮肤细胞生成了FD-iNC,可用于相关疾病的机理研究。研究成果发表在Cell Stem Cell杂志上。

神经嵴(neural crest, NC)出现在胚胎发育早期,能分化为外周神经元、神经胶质以及黑素细胞等。NC功能失调会引起FD,会影响神经对情绪、血压和排便的控制。婴儿出生后只保留有很少的NC,很难分离,限制了我们对NC发育和NC相关疾病的研究。

研究人员将单个转录因子SOX10的过表达,结合激活WNT环境线索,把人成纤维细胞直接重编程为诱导神经嵴细胞(iNC)。研究显示,这些iNC可以在体内分化成为四种主要细胞系,并进行迁移。此外,他们还鉴定了可用来分离iNC的细胞表面标志物CD34。研究人员还利用该方案成功将FD患者的成纤维细胞诱导成为FD-iNC。研究发现FD-iNC有明显的迁移缺陷,科研人员鉴定了412个活性降低的基因,其中98个基因与RNA产物的加工有关。

该研究团队2009年曾利用iPS技术将患者皮肤细胞重编程为NC,而这项研究中的直接重编程技术比iPS要快得多,可节约7~9个月。而且直接重编程生成的FD-iNC,比之前得到的NC更贴近FD患者细胞,这意味着直接重编程更适合这类疾病的研究。

Kim YJ, Lim H, Li Z, Oh Y, Kovlyagina I, Choi IY, *et al.* Generation of multipotent induced neural crest by direct reprogramming of human postnatal fibroblasts with a single transcription factor. Cell Stem Cell 2014; doi: 10.1016/j.stem.2014.07.013.

Stem Cell Res: 扩增培养的MSC经全基因组测序发现遗传变异

中科院北京遗传研究所和美国Johns Hopkins大学的科学家联合对临床常用的扩增的人类间充质干细胞(MSC, p5~p13)进行全基因组分析,发现在其扩增早期,遗传物质比较稳定。研究结果发表在近期的Stem Cell Reports上。

为了达到足够的细胞量,满足越来越多的患者需求,扩增的MSC正越来越多地用于临床,并被证明是安全且有效的。但目前缺乏MSC的遗传信息的完整资料。而保持干细胞基因组完整性是临床治疗安全实施的关键。

科研小组对体外培养的p1和传代培养的p8和p13 MSC进行了全基因组的遗传动态调查。研究发现,直到p8扩增的MSC基因组拷贝数变化(copy-number alterations, CNAs)没有显著变化,单核苷酸变化(single-nucleotide changes, SNCs)较低。引人注目的是,p13 MSC发现大量(677)SNCs。

使用敏感的Droplet Digital PCR测试,通过全基因组测序测试了非同义SNCs,发现原代单核细胞中就存在低频变异(0.01%),前几代的MSC(p1和p8)变异比例为0.1%~1%,但p13达到了17%~36%。

此项研究表明,体外培养的早期阶段MSC维持稳定的基因组,但随着培养时间的延长,受扩增情况下克隆生长的影响产生遗传变异,可能在临床应用中带来风险。

Cai J, Miao X, Li Y, Smith C, Tsang K, Cheng L, *et al.* Whole-genome sequencing identifies genetic variations in culture-expanded human mesenchymal stem cells. Stem Cell Res 2014; 3(2): 227-33.

Blood: 亲缘间单倍型移植有了“优化选择法则”

北京大学血液病研究所黄晓军教授经过10多年的临床血液病移植研究,发现单倍型移植供者的“优化选择法则”,可有效降低移植合并症发病率,提高患者生存率。研究成果公布在近期Blood上。

异基因造血干细胞移植(Allo-HSCT)是治疗血液病最有效方法。近年来患者亲属HLA(human leukocyte antigen)单倍型不合的供者也越来越多,但其选择方式一直存在争论。已经有研究报告说明HLA不合数量与患者生存率并不相关,而供者的年龄、性别却关系着患者的预后。

研究小组整理了从2002年5月到2013年2月在北京大学血液病研究所接受亲属HLA单倍型不合移植的1210例患者资料。研究发现:年轻、男性供者移植组“移植相关死亡率低、生存率高”;父亲较母亲供者组“移植物抗宿主病发病率低、移植相关死亡率低、生存率高”;子女较同胞供者组“移植物抗宿主病发病率低”;父亲较姐姐供者组“移植相关死亡率低、生存率高”;不同同胞较父亲、非父系遗传抗原(NIPA)同胞供者组“移植物抗宿主病发病率低”,从而建立了单倍型移植供者“优化选择法则”。

该研究在大量临床病例基础上提出的供者选择法则,可有效降低移植合并症发病率,提高患者生存率,对血液病临床移植治疗供者的选择具有重要指导意义。

Wang Y, Chang YJ, Xu LP, Liu KY, Liu DH, Zhang XH, *et al.* Who is the best donor for a related HLA haplo-type-mismatched transplant? *Blood* 2014; 124(6): 843-50.

Cell Res: 抗肿瘤药物sunitinib促进胚胎干细胞的自我更新和体细胞重编程

中科院上海药物所谢欣研究组发现激活LIF-STAT3通路或抑制VEGF/VEGFR通路可以有效促进胚胎干细胞(ESC)的自我更新和体细胞重编程。研究结果发表在近期Cell Research上。

常规ESC培养中,科研人员使用LIF激活外在信号或使用GSK3和MEK抑制剂(2i)阻断内在分化通路可以维持ESC的自我更新。

研究小组实验发现,即使在LIF存在的条件下,长期培养的小鼠胚胎干细胞(ESC)还是很容易自发向中内胚层(meso-endoderm)分化,并且分泌

VEGF(vascular endothelial growth factor)。而使用靶向抗肿瘤药物sunitinib抑制VEGF受体(VEGFR)可有效防止ESC的自发分化,并在无LIF和滋养层细胞的条件下促进ESC自我更新。敲除或利用抗体抑制VEGFR2可以模拟sunitinib的作用,促进ESC自我更新。进一步研究显示,缺氧诱导因子HIF1a和内质网应激促进ESC分泌VEGF,抑制这两条通路都对干性维持有利。有趣的是,LIF也会下调上述通路,提示LIF维持干性的作用不止是激活STAT3。

研究人员也调查了sunitinib对Oct4-因子诱导的体细胞重编程的作用。在4因子重编程体系(4F: Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)中,第3~14 d加入sunitinib,得到的iPSC比对照组多8倍,并且处理时间越长,效果越好。研究人员还测试了其他一些靶向VEGFR和PDGFR的抗肿瘤药,发现都能显著促进iPSC生成,除了sunitinib, dovitinib、axitinib和vandetanib促进重编程的效果也很显著。

该研究剖析了自分泌VEGF/VEGFR通路在ESC维持和iPSC生成的作用,并讨论了VEGFR抑制剂VEGFR在干细胞培养、体细胞重编程中的潜在作用,对干细胞研究很有意义。

Chen G, Xu X, Zhang L, Fu Y, Wang M, Gu H, *et al.* Blocking autocrine VEGF signaling by sunitinib, an anti-cancer drug, promotes embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2014; 24: 1121-36.

Cell Rep: 内皮细胞产生心肌细胞维持心脏内在平衡

近日,美国Vanderbilt大学的研究者发现位于冠状动脉的内皮细胞(endothelial cells, ECs)具有心脏干细胞(Cardiac stem cells CSCs)特征,可以产生新的心肌。研究结论最近发表在Cell Reports杂志上。

对于CSCs的来源、CSCs niche的结构组成,目前知之甚少。在先前的研究中,该研究小组发现心脏急性缺血损伤后,内皮细胞通过EndMT(endothelial-to-mesenchymal transition)转变成能产生瘢痕组织的成纤维细胞。而其他研究证明,成人骨的内皮细胞通过EndMT可以产生多能干细胞。研究小组推测,血管的内皮细胞可能产生新的心脏细胞,维持内在平衡。

新的研究中,科研人员使用constitutive and inducible fate-mapping strategies追踪小鼠模型中的

ECs, 发现其具有干细胞特性。ECs以径向方式排列在冠状动脉, 分为两类: 一类静息的心脏干细胞群, 位于血管中膜层, 一类增殖型的心脏干细胞群位于血管外膜层。

该研究证明心脏内皮细胞是心脏内在自我更新的重要组成部分, 冠状动脉构成了CSC的niche。

Fioret BA, Heimfeld JD, Paik DT, Hatzopoulos AK. Endothelial cells contribute to generation of adult ventricular myocytes during cardiac homeostasis. *Cell Rep* 2014; 8(1): 229-41.

Neuron: iPSC分化的神经元移植治疗脊髓损伤大鼠

美国加州大学圣地亚哥分校的科学家使用来自一位老人的皮肤的细胞, 能再生脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠的神经连接。研究结果发表在*Neuron*杂志上。

目前, 一些生物技术公司使用胚胎或胎儿的干细胞来治疗患者的脊髓损伤。神经干细胞(neural stem cells, NSC)在植入SCI损伤处后可以产生大量轴突并向外延伸, 恢复伤处的传导性, 改善机体功能。但是控制移植排斥进行的免疫抑制治疗往往增加患者感染的风险。因此, 无需免疫抑制的其他细胞更具优势。

Tuszynski的研究小组利用iPS技术, 从一个健康的86岁男人采集皮肤细胞进行重编程得到iPSC, 再分化为NSC, 通过特殊的支架移植到脊髓损伤(C5横向半切术)2周的大鼠患处。3个月后, 研究人员发现移植的NSC存活并分化为神经元和胶质细胞, 并分布在整个损伤处。细胞轴突出现粗放型增长现象。这些纤维在动物脊髓损伤有关的瘢痕组织中生长, 并与大鼠原有的神经元发生连接, 形成突触结构。

这项研究证明, 利用iPSC分化的神经元得以在动物中生存, 并横贯疤痕; 可以避免使用免疫抑制剂, 有益于患者。不过, 研究人员认为在临床应用之前还有很多问题需要解决, 比如轴突是否正确连接, 异常连接是否引起不良后果, 其中的作用机制等等。

Lu P, Woodruff G, Wang Y, Graham L, Hunt M, Wu D, *et al.* Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron* 2014; 83(4): 789-96.

Nat Commun: miR-195/497诱导静息的骨骼肌干细胞干细胞

日本京都大学教授濑原淳子率领的研究小组发现了两种能够促进骨骼肌再生的小核糖核酸miR-195/497, 改造的骨骼肌干细胞植入肌肉萎缩症模型动物体内, 可成功实现骨骼肌的再生。研究结果发表在近期的*Nature Communications*上。

骨骼肌干细胞(skeletal muscle stem cells, MuSCs)是脊椎动物骨骼肌再生的主要来源。MuSCs一般情况下是静息的, 只有在损伤或病理状态下, 如杜兴氏肌肉营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD), 恢复细胞周期, 增殖并产生骨骼肌细胞。该研究目的是弄清MuSCs建立和维持静息状态的机制。

从青少年向成人的过程伴随着MuSCs的MyoD蛋白下调。静息的成人MuSCs标志之一就是MyoD蛋白的缺失。比较未成熟和成年小鼠的MuSCs, 发现一些miRNAs能够将增殖的未成熟MuSCs转变为静息状态。筛选得到两种miRNAs: miR-195和miR-497, 在引入增殖状态的未成熟MuSCs后, 显著抑制细胞增殖; 细胞周期分析显示细胞都集中在G₁(G₀)和G₂期, MyoD缺失细胞增加, 标志着静息的成熟MuSCs。机制研究发现miR-195/497靶向Cdc25和Ccmd维持干性。

科研人员还将引入miR-195/497的MuSCs植入DMD模型小鼠, 比起对照组显著增加了骨骼肌再生能力。

该研究证明引入miR-195/497可以维持MuSCs的干性, 同时提高再生潜能。下一步研究内容包括分子机制研究等, 并探讨其在骨骼肌疾病干细胞治疗中的前景。

Sato T, Yamamoto T, Sehara-Fujisawa A. miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat Commun* 2014; 5: 4597.

Mol Cell: SIRT1介导的CRABP II去乙酰化调节细胞维甲酸通路和胚胎干细胞分化

日前, 上海交通大学仁济医院、美国国家环境卫生科学研究所等机构的研究人员, 解析了维甲酸信号和胚胎干细胞分化的调控机制, 这一成果发表*Molecular Cell*上。

维甲酸内稳态是胚胎正常发育的关键,这一物质过多或者过少都会引起相应的先天畸形。SIRT1是最保守的哺乳动物NAD⁺依赖性去乙酰化酶。

研究显示,CRABPⅡ是SIRT1去乙酰化的底物。当细胞缺乏SIRT1时,CRABPⅡ就会出现高度乙酰化,并且聚集在细胞核中,并增强维甲酸信号。CRABPⅡ K102位点上的乙酰化状态调节其在细胞内的定位及后续的维甲酸受体(RAR)激活。

维甲酸诱导胚胎干细胞向多种细胞分化,而缺乏SIRT1时,会加速干细胞分化过程,部分原因是CRABPⅡ。进一步研究表明,SIRT1缺陷的确与小鼠

体内维甲酸信号增强和发育缺陷有关。

这项研究为人们展示了细胞中的维甲酸调控,强调了SIRT1在胚胎发育和干细胞分化中的重要作用。

Tang S, Huang G, Fan W, Chen Y, Ward JM, Xu X, *et al.* SIRT1-mediated deacetylation of CRABPⅡ regulates cellular retinoic acid signaling and modulates embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell* 2014; doi: 10.1016/j.molcel.2014.07.011.

朱丽华 整理