

# 胚胎干细胞移植治疗帕金森病

田雪梅 刘娜 陆敏\*

(中国医学科学院、中国协和医科大学血液学研究所, 天津 300020)

**摘要** 胚胎干细胞起源于植入前胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM), 能够在体外进行增殖并能分化成三个胚层的所有细胞类型。如果能有效地将胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)诱导分化为特定的细胞类型, ES 细胞将成为细胞替代治疗中供体细胞的一个理想来源, 从而可以应用于帕金森病(Parkinson's disease, PD)、糖尿病、心肌梗死等的退行性病变疾病的治疗。近年来, 将ES 细胞来源的多巴胺能神经元用于PD 治疗的研究越来越广泛。现对这些研究中有关基因表达调控、实验研究进展、临床应用以及所遇到的问题作一综述。虽然这些研究还没能最终大面积应用于临床, 但为PD 的治疗提供了一个广阔的应用前景。

**关键词** 胚胎干细胞; 细胞替代治疗; 帕金森病

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)起源于胚胎泡内细胞团, 于1981年, 首次从小鼠体内分离出来<sup>[1]</sup>。迄今为止, 胚胎干细胞系可以从啮齿类、兔、猪以及灵长类动物中获取。人类胚胎干细胞系自1998年成功建立<sup>[2]</sup>以来, 被广泛用于各种基础研究。

ES 细胞具有显著区别于其他细胞系的特性: 其中最重要的一点就是发育的全能性以及体外无限扩增的能力, 这为ES 细胞的研究和应用提供了无限的细胞资源, 近年来已证明ES 细胞能够向造血细胞、心肌细胞、神经细胞、肝细胞以及视网膜上皮细胞<sup>[3-8]</sup>等分化, 因此ES 细胞在细胞替代治疗(cell replacement therapy, CRT)中具有潜在的应用价值。CRT 的原则就是利用有功能的细胞去替代那些受损或老化的细胞, 从而恢复组织或器官的正常功能, 同时也可以称其为再生生物学。如果这种新型的治疗方法能够得到成熟广泛的应用, 它会比那些药物治疗或手术治疗等传统的治疗方案更具优越性, 更能有效地重建病变部位的正常功能。目前这种治疗方案最大的障碍就是可供使用的细胞资源的严重不足, 随着这些年来研究的深入, ES 细胞以其无限增殖和多向分化的潜力在CRT 中的应用越来越广, 许多研究开始转向利用ES 细胞的多向分化能力得到能够用于临床治疗的各种终末分化的细胞, 例如多巴胺能神经元<sup>[9]</sup>、神经视网膜前体细胞<sup>[10]</sup>、心肌细胞<sup>[11]</sup>等等。帕金森病(Parkinson's disease, PD)的CRT 方案主要依据是通过神经元移植恢复黑质的多巴胺递质水平。大量动物实验研究有力地证明了来源于ES 细胞的移植细胞在形态与功能上具备多巴胺能神经元

的特性, 它们能够修复黑质损伤, 与宿主神经元形成突触联系, 释放多巴胺, 并能接受来自宿主细胞的传入冲动。但这些还没能大面积应用于临床, 目前在临床上用CRT 治疗PD 最多的是用人胚中脑组织块移植, 临床实验结果显示移植的多巴胺能神经元能在患者大脑内存活并形成功能联系, 并且同患者大脑神经元发生整合, 移植后也有利于症状的缓解<sup>[12,13]</sup>。

## 1 ES 细胞移植治疗PD 的实验研究及应用

### 1.1 PD 的研究治疗现状

PD 是以中脑黑质以及纹状体多巴胺能神经元的进行性缺失而造成的神经退行性病变为主的疾病<sup>[14]</sup>。作为神经递质, 多巴胺介导黑质纹状体通路到纹状体尾壳核的信号转导。多巴胺缺乏导致锥体外系功能失常, 从而产生静止性震颤, 肌强直, 运动障碍等临床症状。目前治疗PD 可以用药物治疗和神经外科的方法。左旋多巴胺等药物治疗有一定的疗效, 但长期使用后疗效下降, 而且会产生一些副反应<sup>[15]</sup>。神经外科手术有一定的风险和创伤。这样就需要转变治疗方案, 有大量的研究证实胎脑组织细胞移植能够有效地缓解PD 的症状<sup>[16]</sup>, 但是这种治疗方案同样具有局限性, 这既有伦理学上的问题又存在大量获取胎脑组织在技术上和来源上的难题。所以较为理想的方法就是找到能产生多巴胺的细胞或能分化成多

收稿日期: 2007-06-28 接受日期: 2007-11-15

国家自然科学基金资助项目(No.30570357)

\* 通讯作者。Tel: 022-87410797, Fax: 022-87410801, E-mail:

minlu001@yahoo.com

多巴胺神经元的干细胞,这样将会从根本上解决多巴胺神经元的来源问题。许多科学家尝试从胚胎干细胞诱导多巴胺能神经元的产生,这能够解决利用胎儿组织移植所遇到的很多伦理学和难题。近些年来干细胞技术取得了迅速的进展,ES细胞的分离、纯化、建系及定向诱导分化技术日益成熟,为PD的细胞治疗提供了一条新的研究方向。

## 1.2 体外诱导ES细胞分化为多巴胺能神经元

成功地将ES细胞作为PD细胞移植治疗的工具,首要的就是要将其分化为多巴胺能神经元以及将其从混合细胞群体中分离出来并确认其具有正常的生理功能。早期的时候有学者考虑直接将ES细胞移植到PD大鼠模型体内,在这种情况下,虽然ES细胞可以部分分化为酪氨酸羟化酶阳性神经元,但发现把小剂量的ES细胞移植到PD小鼠运动模型黑质部,数周后约20%小鼠大脑见到畸胎瘤。他同时指出,如果将此法运用到人类PD患者,那么要求移植后至少一年内没有并发畸胎瘤。这样,基于临床应用的安全性,要求ES细胞必须在体外先分化为较成熟细胞后再实施移植。这样就可以大大降低畸胎瘤的发生率。而且这些由ES细胞先在体外进行分化而来的多巴胺能神经元可以在移植的动物模型内存活32周以上仍有功能,而且对移植动物有持续的行为恢复作用<sup>[17]</sup>。同时发现如果延长ES细胞在体外分化为多巴胺能神经元的时间也可以有效地降低畸胎瘤的发生率<sup>[18]</sup>。以上这些证据说明ES细胞可以作为功能性多巴胺能神经元的一个有效的来源。

目前,将ES细胞体外诱导分化为多巴胺能神经元有很多种方法,通常都需要加入各种诱导因子,例如视黄酸(retinoic acid, RA)、音猬因子(sonic hedgehog, SHH)、FGF8、基质细胞以及一些关键性的转录因子,例如Pax2、Pax5以及EN1等等。现在最常用的就是ES细胞和PA6小鼠基质细胞共同培养的方法,例如Zeng等<sup>[19]</sup>用人ES细胞与PA6小鼠基质细胞共同培养,随后将细胞移植到6-羟基多巴胺处理过的小鼠纹状体中,移植五周发现有大量的酪氨酸羟化酶阳性细胞存活,而且移植后未发现未分化的ES细胞。Buytaert-Hoefen<sup>[20]</sup>等在PA6小鼠基质细胞作为基层层的基础上加入胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)能使TH(+)细胞数成倍增加;他们还将人类ES细胞与来源于胚胎纹状体的星形胶质细胞共培养也可产生大量的TH(+)细胞,将人ES细胞与来源于胚胎中脑的星形胶质细

胞共培养产生的TH(+)细胞做对比,前者比后者高出很多。即纹状体星形胶质细胞和PA6小鼠基质细胞都能促进人ES细胞向TH(+)表型细胞的分化,而且GDNF的加入能够增加该表型细胞的数量,这在其他许多文献中也都有报道。但将任何蛋白质移入脑组织都要面临一个血脑屏障的问题。Behrstock等<sup>[21]</sup>研究发现人类神经前体细胞可以在诱导型启动子系统存在的情况下在体外进行遗传学修饰进而释放GDNF。他们将人神经祖细胞(human neural progenitor cell, hNPC)-GDNF移植入多巴胺系统部分损坏的小鼠纹状体内,移植后两周这些细胞在纹状体内移行并且释放生理水平的GDNF,这可有效地促进宿主体内多巴胺能神经元的存活。而且在移植后五周对小鼠功能的改善仍旧十分明显,在八周的时候这种细胞已经移行至整个纹状体而且继续释放GDNF。如果将hNPC-GDNF植入猴脑中,在移植入三个月内都能够存活并释放GDNF。这样就可以通过遗传学修饰的方法绕过这个血脑屏障的问题,从而保证使用的安全性以及向特定的靶器官释放生长因子的能力。

以上这些研究都是使用各种复杂的培养基而且这些培养基成分不明确,或者和其它各种组织或细胞一起进行培养,而且这些基质细胞通常是动物源性的。这存在很多的缺陷,首先这些研究方法大多是通过延长培养时间从而使ES细胞充分表达多巴胺能神经元的特征,虽然这样可以达到一定的分化目的,但在这种过程中,除了一些不可避免的机械操作之外,细胞往往会经历非常复杂的过程以致造成最后较少的收获量。使用被移植到脑内存活的细胞数可能会更少<sup>[22,23]</sup>。其次如果使用含血清的复合培养基或其它不确定成分的条件培养液,甚至直接与其他组织或细胞一起进行培养(例如小鼠PA6基质细胞),一些动物源性的物质往往会含有与人ES细胞融合的免疫源性物质<sup>[24]</sup>,它们移植入脑后最终会引起免疫排斥反应,即使最后可能会被排出体外,也可能会有些动物源性的物质残留。有学者尝试使用一种无血清仅含化学成分确定的人源性的介质添加剂和基质,这种物质能够迅速而有效地诱导人胚胎干细胞分化成多巴胺能神经元<sup>[25]</sup>,他们比较分析了不同来源的人胚胎干细胞系在三周内分化为多巴胺能神经元的能力,同时在早期收获细胞,这样就能减少许多细胞的损伤,而以这些多巴胺能神经元在移入后继续在体内分化的过程来检测分化的能力,这样就避免了以往方法的许多弊端。最近也有一些比较新型的分化方法,例如有学

者将短尾猴 ES 细胞聚集吸附于琼脂糖微粒体上再进一步将其分化为能够释放多巴胺能神经元的细胞<sup>[26]</sup>。也有文献报道说骨髓间充质干细胞可以增强由胚胎干细胞分化的多巴胺能细胞和神经元细胞的存活<sup>[27]</sup>。

### 1.3 ES 细胞分化为多巴胺能神经元的过程中细胞因子和基因的作用

诱导 ES 细胞分化为多巴胺神经元,起重要作用的是各种细胞因子和诱导剂。在该过程中发挥作用的各种细胞因子和诱导剂有很多种,例如 GDNF、SHH、白介素  $\beta$ 、双丁酰环腺苷酸、TGF- $\beta$  等等,实验证明,它们都能在 ES 细胞分化为多巴胺能神经元的过程中增加 Nurr1 以及酪氨酸羟化酶 mRNA 的水平,同时在诱导多巴胺能神经元分化的终末阶段可以发现抗凋亡基因 bcl-2 的 mRNA 水平也发生了上调<sup>[28]</sup>。而且 SHH 还能与 BMP7 相互作用直接调控下丘脑多巴胺神经元以 Six3- 依赖的方式进行发育<sup>[29]</sup>。这两种信号协同作用能够直接促使来源于小鼠 ES 细胞的神经前体细胞在体外分化成下丘脑多巴胺能神经元。而 GDNF 除了对多巴胺能神经元的体外分化有直接的促进作用外,也在其它很多方面间接发挥作用,例如 1- 甲基-4- 苯基吡啶[MPP(+)]可以导致人类 PD,而且对来源于人 ES 细胞的多巴胺能神经元有毒性作用,而用 GDNF 处理却可以保护 TH(+)神经元免受 MPP(+ )诱导的凋亡细胞坏死,神经元的缺失以及避免细胞内活性氧簇的形成<sup>[30]</sup>。

与 ES 细胞分化为多巴胺神经元相关的基因有早期中枢神经系统基因 nestin、Otx1、Otx2, 中脑基因 Pax2、Pax5、Wnt1、En1 和中脑多巴胺神经元特异性基因 Nurr1。利用遗传操作在特定阶段导入某个基因必将增加多巴胺神经元的数量。例如 Nurr1 就是促进多巴胺能神经元分化的一个很重要的基因,通过它的过表达从成体鼠脑室下区和白质区分离得到的神经前体细胞可以发育成为有功能的多巴胺神经元<sup>[31]</sup>。而且 Nurr1 和 Pitx3 共同作用便可以促进体外培养的小鼠或人类胚胎干细胞分化为成熟的中脑多巴胺能神经元表型<sup>[32]</sup>。Nurr1 在中脑多巴胺能神经元表型的维持过程也发挥着重要作用,同时它还参与 GDNF 家族受体的相互作用。

同时也有文献报道表皮生长因子- 集落形成细胞蛋白(EGF-CFC protein, Cripto)和 DJ-1 对多巴胺能神经元的影响。Cripto 在 ES 细胞诱导成神经元的信号转导过程中发挥着重要的作用<sup>[33]</sup>。实验结果显示 Cripto(-/-) 的胚胎干细胞可以在体外有更强的多巴胺

能神经元分化的能力,而且将该分化的神经元移植入 PD 模型的小鼠后可以观察到明显的行为改善。

DJ-1 是在两个家族性常染色体隐性遗传的 PD 中发现的,在这两个家族遗传图谱中都发现了 DJ-1 的双突变。在毒素处理过的 DJ-1-deficient 细胞中会有活性氧簇的蓄积,这些细胞在开始的时候表现正常,但它们不能应对连续的操作修复而最终开始凋亡。而且最近有实验显示由 DJ-1-deficient 的 ES 细胞分化而来的多巴胺能神经元会出现生存的下降以及对氧化刺激敏感性的增强<sup>[34]</sup>。这提示 DJ-1 基因对多巴胺能神经元是起着保护性作用的,同时也为细胞移植治疗提供了一种基因学修饰的方法。

### 1.4 来源于 ES 细胞的多巴胺能神经元治疗 PD 的临床以及动物实验

在成功地将 ES 细胞诱导为有功能的多巴胺能神经元之后,接下来就应该是大量的动物实验以及应用于人体的临床使用。虽然在临床上对人体移植的结果还未见报道,只有文献报道说利用 ES 细胞进行的首例人类临床实验已于 2006 年在美国进行<sup>[35]</sup>。但目前已经有大量成功的动物实验:例如 Ben-Hur 等<sup>[36]</sup>首先在体外将 ES 细胞分化为神经前体细胞然后将其移植到 PD 的小鼠模型中,分别于移植后二周、四周、八周、十二周观察旋转行为的恢复。没有进行移植的两只对照小鼠没有发现任何行为的恢复,而实验组与对照组相比旋转行为有了明显的恢复,TH 阳性神经元的数量以及对震颤的协调能力的改善都具有统计学意义。再有,Cho 等<sup>[37]</sup>将分别来源于 D3 和 N2 两种 ES 细胞系的多巴胺能神经元移植入 PD 小鼠模型中来观察其行为的恢复,移植后两周,来源于 N2 细胞系的多巴胺能神经元移植后的小鼠有明显的行为恢复,而来源于 D3 细胞系的多巴胺能神经元似乎对小鼠行为的恢复没有很大的作用。

## 2 问题与展望

### 2.1 ES 细胞移植治疗 PD 的局限性

ES 细胞体外诱导为多巴胺能神经元的研究日新月异,诱导步骤逐渐简化,诱导时间逐渐缩短,分化效率大大提高,神经细胞分化途径也越来越接近体内神经细胞分化。分子生物学和转基因方法在分化过程,分化产物的鉴定和分离上也起了重要作用:ES 细胞向多巴胺神经元的诱导分化为研究体内神经系统早期分化提供了良好的模型,也为中枢神经系统的一些退行性疾病的细胞治疗提供了有效的供体细胞。

同时,也应该清醒地认识到ES细胞分化治疗体系还存在不少问题:首先最重要的是安全性的问题。为防止畸胎瘤的形成,需要将终末分化的细胞类型纯化出来。这就需要很多新的技术方法用于分离终末分化的细胞,例如对Oct4阳性细胞进行负性筛选可能成为解决这个问题的方法之一;再者,可以将一些死亡信号标记于植入的ES细胞,这样,当它们开始形成肿瘤或引起严重的并发症时,就可以启动这些死亡信号而从受体体内清除掉。其次,利用常规的诱导分化方法诱导出的一般都是混合的细胞群体,这样,为了得到感兴趣的单一的细胞群体,同样需要采用更有效的筛选方法,基因筛选可能会成为可供选择的方法之一。例如将某个选择性标记或荧光标记置于某个特定细胞类型的启动子控制之下,当这种特定的细胞类型开始分化时其启动子被激活,这样那些选择性标记或荧光标记就会在起启动子的控制下开始表达,这样就可以利用那些选择性标记或荧光标记的表达来筛选所感兴趣的特定细胞类型。再有可以利用细胞表面不同的标记抗原用磁珠分选的方法将特定的细胞群体分选出来,或者用荧光标记抗体与细胞表面标记结合,再利用荧光激活细胞分选术(FACS)来进行筛选,例如Fukuda等<sup>[38]</sup>利用该技术筛选出Sox1(一种神经前体细胞的标志)阳性的细胞,使其分化为多巴胺神经元并移植入小鼠模型体内,并没有观察到畸胎瘤的形成,而对照组中将Sox1阴性的细胞分化后移植到小鼠模型体内后就会观察到畸胎瘤的产生。神经元移植过程中的免疫排斥问题同样限制着细胞移植中的应用。一个较吸引人的进展是ES细胞的MHC可以被宿主的MHC取代,这样宿主的免疫系统就会把植入的细胞认为是自己的<sup>[39]</sup>,这种方法可以通过同源染色体重组的技术来实现;另一种解决的方法是在胚胎干细胞中插入免疫抑制的分子例如Fas配体<sup>[40]</sup>,与此相关的一个有趣的解决方法就是ES细胞核移植技术的应用。在这种情况下,在ES细胞中完整的MHC区域和其他免疫分子都和病人的完全一致,只有很少一部分起源于线粒体基因的免疫分子不同。这种方法同以上方法比较而言是免疫排斥反应最小的一种。但是这种方法却遇到了许多伦理学的问题以及技术上的难题而限制了它的使用。还有目前对体内外调控ES细胞向特定细胞类型诱导分化的各种因子还缺乏深入的认识,因此要得到向特定方向分化的ES细胞后代还很困难,这就需要对其诱导分化为特定细胞类型过程中的调控机制做更深入的研究。

## 2.2 ES细胞移植治疗PD的临床应用前景

从临床应用的角度来看,细胞替代治疗仍然处于发展阶段,尽管在移植实验中很多动物实验已经证明了来源于ES细胞的多巴胺能神经元对PD有很好的治疗作用,但将这种方法广泛的应用于临床还有很长的路要走,还需要在啮齿类动物和灵长类动物上做更深一步的研究,以确保该类移植细胞存活的长期性,作用的安全性和有效性。但无论如何,细胞替代治疗PD有它潜在的优势,例如它能够替代那些死亡的神经元,复元功能性突触在神经支配的部位释放多巴胺神经元的特性,以及在理想情况下完全恢复黑质纹状体系统的功能。如果人们掌握了怎样由ES细胞大量发育成多巴胺能神经元,以及怎样将它们植入到特定的部位并有效地恢复多巴胺神经递质系统的技术方法,在将来人们就有希望通过细胞移植彻底治愈PD。

### 参考文献 (References)

- [1] Evans MJ *et al. Mol Biol Med*, 1989, **6**: 557
- [2] Thomson JA *et al. Science*, 1998, **282**: 1145
- [3] Keller GM *et al. Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7**: 862
- [4] Filippi MD *et al. Exp Hematol*, 2000, **28**: 1363
- [5] O'Shea KS. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, **27**: 705
- [6] Hancock CR *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **271**: 418
- [7] Jones EA *et al. Exp Cell Res*, 2002, **272**: 15
- [8] Zhao X *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **297**: 177
- [9] Parmar M *et al. BMC Dev Biol*, 2007, **7**: 86
- [10] Vugler A *et al. Mech Dev*, 2007, **124**: 807
- [11] Hakuno D *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 39534
- [12] Cochen V *et al. Mov Disord*, 2003, **18**: 928
- [13] Olanow CW *et al. Ann Neurol*, 2003, **54**: 403
- [14] Youdim MB *et al. Sci Am*, 1997, **276**: 52
- [15] Olanow CW *et al. Neurology*, 2000, **55**: S72
- [16] Freed CR *et al. N Engl J Med*, 2001, **344**: 710
- [17] Rodriguez-Gomez JA *et al. Stem Cells*, 2007, **25**: 918
- [18] Brederlau A *et al. Stem Cells*, 2006, **24**: 1433
- [19] Zeng X *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 925
- [20] Buytaert-Hoefen KA *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 669
- [21] Behrstock S *et al. Gene Ther*, 2006, **13**: 379
- [22] Schulz TC *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 1218
- [23] Yang M *et al. Cell Transplant*, 2004, **13**: 535
- [24] Martin MJ *et al. Nat Med*, 2005, **11**: 228
- [25] Iacovitti L *et al. Brain Res*, 2007, **1127**: 19
- [26] Ando T *et al. Tissue Eng*, 2007, **13**: 2539
- [27] Shintani A *et al. No Shinkei Geka*, 2007, **35**: 607
- [28] Rolletschek A *et al. Mech Dev*, 2001, **105**: 93
- [29] Ohyama K *et al. Development*, 2005, **132**: 5185
- [30] Zeng X *et al. Neuropsychopharmacology*, 2006, **31**: 2708
- [31] Shim JW *et al. Stem Cells*, 2007, **25**: 1252
- [32] Martinat C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2874

- [33] Parish CL *et al.* *Stem Cells*, 2005, **23**: 471  
[34] Martinat C *et al.* *PLoS Biol*, 2004, **2**: e327  
[35] Groebner M *et al.* *Internist (Berl)*, 2006, **47**: 502  
[36] Ben-Hur *et al.* *Stem Cells*, 2004, **22**: 1246  
[37] Cho YH *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**: 6  
[38] Fukuda H *et al.* *Stem Cells*, 2006, **24**: 763  
[39] Hardy RR *et al.* *Curr Opin Immunol*, 1998, **10**: 155  
[40] Harlan DM *et al.* *JAMA*, 1999, **282**: 1076

## Embryonic Stem Cell Transplantation Therapy in Parkinson's Disease

Xue-Mei Tian, Na Liu, Min Lu\*

(Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

**Abstract** Since the murine embryonic stem cells were isolated in 1981, embryonic stem (ES) cell can be harvested from the rodents, the rabbits, the swines and human. The first derivation report of human ES cell in 1998 provoked the field of human ES cell research. ES cell are derived of the inner cell mass of the early embryo, they can proliferate infinitely *in vitro* while retaining the ability to differentiate into all somatic cells. Although this field is only in its infancy, human ES cell represent a theoretically inexhaustible source of precursor cells that could be differentiated into any cell types to treat the degenerative diseases such as the diabetes, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, spinal cord injury, heart failure, and bone marrow failure. In recent years, the therapy research of the Parkinson's disease using dopaminergic neuron derived of ES cell is extensively more and more. This review updates the gene expression, the progression of empirical study, the clinical application and the problems encountered of these researches. Although these researches has not be utilized in clinic in large areas, they provided a wide application perspective for the therapy of the Parkinson's disease.

**Key words** embryonic stem cell; cell replacement therapy; Parkinson's disease

Received: June 28, 2007 Accepted: November 15, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30570357)

\*Corresponding author. Tel: 86-22-87410797, Fax: 86-22-87410801, E-mail: minlu001@yahoo.com