

## 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。

**Nature: 脾脏中骨髓外造血的内环境**

美国德克萨斯大学西南医学中心的研究人员发现,当组织受到损伤而失血过多或在怀孕情况下,脾脏内的紧急造血系统就会激活。相关研究结果近期发表在国际学术期刊*Nature*上。

一般情况下,造血干细胞主要驻留在骨髓内,脾脏内几乎不存在造血干细胞。但脾脏内会有一些细胞能够为造血干细胞营造合适的环境。在一些需要更多血细胞的紧急状态下,造血干细胞会从骨髓迁移到脾脏,进行骨髓外造血(extramedullary haematopoiesis, EMH)。

在这项研究中,研究人员利用小鼠模型对脾脏内血细胞形成所需的微环境因子——干细胞因子(SCF)和CXCL12进行了研究。在骨髓、失血或妊娠引发的EMH情况下,小鼠脾脏脾髓血窦(sinusoids in the red pulp)中的内皮细胞和血管周围的Tcf21<sup>+</sup>间质细胞表达Scf,一部分Tcf21<sup>+</sup>间质细胞还表达Cxcl12。通过诱导增殖,EMH诱导大量扩增Scf<sup>+</sup>内皮细胞和间质细胞,以维持迁入脾脏的造血干细胞的活性。

在紧急情况下,肾脏内的内皮细胞和血管周围间质细胞会受到诱导发生增殖,这一过程对于应答造血应急状况具有非常重要的作用。选择性清除脾脏内皮细胞的Scf或间质细胞的Scf及Cxcl12,会严重影响脾脏的EMH,减少血细胞数量,但不影响骨髓造血。

这项研究表明,脾脏内皮细胞和间质细胞为骨髓外造血提供了适宜的内环境,能够在紧急状态下发挥重要的造血作用。

Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, *et al.* A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature* 2015; 527(7579): 466-71.

**Nat Commun: 组蛋白H1调控生殖干细胞自我更新机制**

清华大学和同济大学等单位的合作研究首次在个体水平证实,组蛋白H1和MOF竞争性调节H4K16乙酰化水平,抑制生殖干细胞分化和卵巢肿瘤形成。该研究成果于近日在*Nat Commun*杂志在线发表。

研究人员研发了新一代条件性转基因干扰技术,可有效并特异地调节H1表达水平。研究发现:(1)在生殖干细胞中,H1的敲低会导致生殖干细胞丢失,而在其基质细胞中敲低H1会引起生殖干细胞分化缺陷,形成卵巢肿瘤;(2)H1抑制生殖干细胞最重要的分化因子bam;(3)H1选择性调控H4K16乙酰化;(4)过表达H4K16乙酰化酶MOF,导致生殖干细胞数量下降,而引入非乙酰化形式H4R16,干细胞数目升高,说明H1敲低引起的表型与H4K16乙酰化相关;(5)通过干扰MOF来降低H4K16乙酰化水平,可以挽救由于H1敲低引起的干细胞丢失和卵巢肿瘤生成。

该研究为生殖干细胞本身的自我更新和定向分化之间的互动提供了一条重要的新线索。

Sun J, Wei HM, Xu J, Chang JF, Yang Z, Ren X, *et al.* Histone H1-mediated epigenetic regulation controls germline stem cell self-renewal by modulating H4K16 acetylation. *Nat Commun* 2015; 6: 8856.

**Chem Bio: 抑制干性结合定向分化,将多能干细胞转化为功能性神经元**

韩国成均馆大学的科学家们研究发现,大肠杆菌中的一个蛋白质Skp,可与小分子结合并协同作用,推动多能干细胞转化为功能性神经元,该研究论文发表在*Chem Bio*上。

Yamanaka因子之一Sox2影响干细胞维持干性和多能性。抑制其可以消除多能性,诱导分化为各

种细胞。Sox2与一个细菌伴侣蛋白Skp结合,可抑制其活性。

将多能干细胞P19转导Sox2抑制剂细菌伴侣蛋白Skp,然后加入神经发生诱导剂neurodazine(Nz)和neurodazole(Nzl)共培养。细胞会选择性地转化为神经元,能够产生去极化-诱导钠离子电流和动作电位,这证明分化的神经元具有电生理活性。信号通路研究表明,Skp与神经发生诱导剂联用,可以激活Wnt和Notch通路,促进P19细胞的神经发生。

蛋白质和化学诱导剂指导的谱系特异性定型,对干性的组合抑制的联合分化策略对于多能干细胞向有活性功能的神经元的选择性分化具有深刻意义。使用病毒介导的干细胞基因传递有导致任何遗传改变或不稳定的风险,相形之下,使用蛋白质分子没有这方面的担心,能够保证临床应用的安全性。

Halder D, Chang GE, De D, Cheong E, Kim KK, Shin I. Combining suppression of stemness with lineage-specific induction leads to conversion of pluripotent cells into functional neurons. *Chem Biol* 2015; 22(11): 1512-20.

#### **Acta Biomater:** 引导脊髓组织内源干细胞定向分化可以促进脊髓损伤动物的功能恢复

中国科学院遗传与发育生物学研究所戴建武研究团队引导脊髓组织内源干细胞定向分化,促进脊髓损伤动物的功能恢复。相关研究在线发表于*Acta Biomater*上。

脊髓损伤修复是世界医学难题。大量研究表明,脊髓损伤后损伤部位存在多种抑制分子如Nogo-A、ephrinB3、sema4D等,形成了抑制脊髓再生的微环境。

该研究团队将胶原支架材料与具有胶原特异结合能力的髓鞘抑制分子ephrinB3和sema4D各自的拮抗蛋白CBD-EphA4-LBD和CBD-PlexinB1-LBD以及有胶原特异结合能力的神经营养因子CBD-BDNF和CBD-NT3进行结合。通过移植上述功能支架材料到大鼠脊髓T10全横断模型之中来建立促进神经再生的微环境。此外,他们还在大鼠全横断损伤后脊髓的两个断端分别注射cAMP来激活脊髓神经元内在的再生信号通路。

术后三个月,研究人员发现,比起空白对照组及单纯支架材料移植组,经过复合治疗的大鼠较大鼠

在损伤区内神经纤维的再生数量、再生神经纤维的再髓鞘化程度、再生组织的血管化程度以及后肢行为学恢复程度等方面均表现出显著的优势,而且复合治疗组的大鼠的损伤区能检测到大量新生神经元,这被认为是大鼠功能恢复的细胞学基础。这类新生神经元很可能是在脊髓受损后由迁移至损伤区内的内源性神经干细胞分化而来。功能支架材料在大鼠损伤区提供了一个适合内源神经前体细胞向神经元定向分化的微环境。

该研究结果表明,定向诱导内源神经干细胞或移植的外源神经干细胞在损伤区内向神经元分化是脊髓损伤修复的重要机理。对于指导脊髓损伤的临床治疗具有重要意义。

Li X, Han J, Zhao Y, Ding W, Wei J, Li J, *et al.* Functionalized collagen scaffold implantation and cAMP administration collectively facilitate spinal cord regeneration. *Acta Biomater* 2016; 30: 233-45.

#### **Cell Res:** 建立卵子来源的孤雌生殖单倍体胚胎干细胞

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所李劲松研究组从卵子中产生了能代替精子使用的单倍体胚胎干细胞,并证明这些细胞能高效产生半克隆小鼠,研究成果在线发表在国际学术期刊*Cell Res*上。

2012年,李劲松研究组与徐国良研究组合作从小鼠的精子中建立了孤雄单倍体胚胎干细胞系,并证明这些细胞能够代替精子使卵母细胞“受精”产生半克隆小鼠。不过该技术借助复杂的核移植技术,极大地限制了单倍体细胞技术的应用。为此,研究人员尝试是否能从卵子建立可代替精子使用的单倍体细胞系。

研究人员首先通过孤雌激活卵子的方法获得了单倍体的孤雌发育的囊胚,并从中建立了6株孤雌单倍体胚胎干细胞,随后他们将其注入卵子中产生胚胎并移植到假孕小鼠的子宫内,然而所有的移植胚胎均不能发育成个体。基于研究组此前的研究发现,研究人员尝试在孤雌单倍体干细胞中敲除H19-DMR和IG-DMR。令人惊奇的是,敲除H19-DMR和IG-DMR的孤雌单倍体干细胞能高效支持半克隆小鼠的产生,达到15.5%的出生效率。而且,半克隆小鼠均能健康发育到成年并具有生育能力。

这一研究从卵子中产生了能代替精子使用的单倍体细胞, 并证明这些细胞能高效产生半克隆小鼠, 从而大大简化了单倍体干细胞技术, 将促进单倍体干细胞的应用。

Zhong C, Xie Z, Yin Q, Dong R, Yang S, Wu Y, *et al.* Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection. *Cell Res* 2016; 26(1): 131-4.

### **Sci Rep:** 利用CRISPR技术将人胚胎干细胞分化为视网膜神经节细胞

美国约翰霍普金斯大学的研究人员将人类多能干细胞有效转化成为视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC), 有助于视神经的研究。相关研究发表于*Sci Rep*上。

视网膜神经节细胞位于视网膜, 可以将眼睛中的视觉信号传至大脑。对于青光眼或其他神经疾病患者, RGC细胞损失或死亡是造成视力下降或失明的主要原因。

BRN3B是RGC的重要标记, 在大多数RGC上表达。研究人员利用CRISPR-Cas9基因编辑技术, 在H7 hESC内插入荧光蛋白mCherry标记, 一旦细胞分化成为RGC, 就会在显微镜下呈现出红色。研究人员将改造过的A81-H7 hESC铺在Matrigel上, 加入N2B27分化培养基。10 d细胞长满培养皿, 25 d前mCherry标记显现。荧光标记布满新生的被认为是RGC的细胞整体, 包括细胞的胞体和突触。

科研人员利用qPCR技术对A81-H7 hESC整个分化过程的视网膜相关标记进行了检测, 发现其和普通的视网膜发育过程相似, 表达所有的视网膜细胞的标记。随后, 研究人员利用FACS系统将新分化形成的视网膜神经节细胞进行分离纯化。分选后的细胞在铺板后几小时内发育出轴突, 可存活数月。TEM观察细胞的超微结构, 发现其与体内RGC一致。钙离子影像(calcium imaging)也显示了与成熟RGC相关的生理特性。这些结果证明, A81-H7 hESC成功分化为RGC。

研究者还发现, 利用纳米纤维支架以及添加forskolin可以提高多能干细胞转变为视网膜神经节细

胞的效率。在接下来的实验中, 科研人员希望利用CRISPR技术继续优化多能干细胞-RGC的分化策略, 最终可以帮助开发治疗青光眼和视神经疾病的新疗法。

Sluch VM, Davis CH, Ranganathan V, Kerr JM, Krick K, Martin R, *et al.* Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line. *Sci Rep* 2015; 5: 16595.

### **Nature:** 钙离子调节肠道干细胞活性

美国加州Buck研究所的研究人员发现, 果蝇的肠道干细胞(intestinal stem cell, ISC)能对不同细胞内钙离子信号产生应答, 调节其增殖活性。这一研究成果公布在近日的*Nature*杂志上。

成体干细胞动态地调节细胞增殖和分化, 维持组织内平衡。肠道干细胞非常活跃, 这些细胞会收到许多信号, 分别来自饮食、肠道菌群、入侵的细菌, 还有一些压力因素。其中的机制尚未明确。

科研人员首先发现了肠道干细胞具有L-谷氨酸受体(mGluR), 膳食中L-谷氨酸能刺激干细胞分裂, 以及果蝇的肠道生长。之后, 通过果蝇肠道的活体干细胞成像, 研究人员发现, 干细胞中的钙离子水平能进行振荡调控, L-谷氨酸能通过mGluR/Gaq/PLC $\beta$ 通路, 触发细胞内钙离子持续增加而调节干细胞活性。研究发现, 较高的胞质内钙离子浓度通过调节钙离子敏感蛋白磷酸盐(Calcineurin)和CREB调节的转录共活化因子(Crtc)诱导ISC的增殖。

研究表明, 干细胞中钙离子水平变化并不仅限于对L-谷氨酸的应答, 这些细胞对其他刺激, 比如感染和组织损伤也会做出应答。

该研究揭示了细胞内钙离子浓度以及对钙离子变化产生应答的蛋白, 都是干细胞活性的一种主调控因子。下一步科研人员还将进一步探索这种调控系统对疾病干细胞以及肠道衰老疾病相关干细胞的影响。

Deng H, Gerencser AA, Jasper H. Signal integration by Ca<sup>2+</sup> regulates intestinal stem-cell activity. *Nature* 2015; 528(7581): 212-7.