

综述

诱导神经上皮干细胞的临床转化前景及挑战

艾宗勇 刘国库 牛宝华 赵淑梅 李天晴*

(昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

摘要 诱导神经上皮干细胞(induced neuroepithelial stem cells, iNECs)具有很强的增殖能力和分化潜能, 具有重要的科学和临床应用价值。通过iNECs自体移植产生功能性神经元, 在治疗神经性疾病和神经损伤中具有广阔的前景。然而, 当前只能通过外源基因过表达的方法获得灵长类iNECs, 这存在未知的安全风险。因此, 通过小分子化合物、3D微环境、压力刺激等非外源基因导入法获得灵长类iNECs显得重要而迫切。长期以来, 大量的研究使用啮齿类动物模型来探索药物和细胞在体内的安全性和有效性, 然而啮齿类动物与人存在的巨大物种差异导致很多研究在临床试验中失败。因此, 借助与人类亲缘关系相近的非人灵长类动物进行研究, 进而评估和测试iNECs在体内的安全性和有效性, 是推动人iNECs进入临床转化更有效的方法。

关键词 灵长类; 诱导神经上皮干细胞; 非外源基因导入; 自体移植; 临床转化

Clinical Translational Prospects on Primate Induced Neuroepithelial Stem Cells and Its Challenges

Ai Zongyong, Liu Guoku, Niu Baohua, Zhao Shumei, Li Tianqing*

(Institute of Primate Translational Medicine, Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract Induced neuroepithelial stem cells (iNECs) are highly proliferative, have strong differentiation potential and are very valuable for scientific research and clinical treatment. iNECs, which can regenerate functional neurons to repair nervous system *in vivo* by autograft, hold great promise for developing stem cell therapy in neurological diseases and nerve damage. However, currently primate iNECs only can be generated by overexpression of exogenous genes, which cause potential safety risks in clinic applications. Therefore, it is important and urgent to explore non-transgenic methods to convert primate somatic cells into iNECs, such as chemical compounds, three-dimensional microenvironment, external stimuli and etc. Many researchers evaluate the safety and effectiveness of medications and cells by rodent models for a long-term, however, the significant species differences between rodent and human are the primary causes of clinical trial fail for most researches. Non-human primates are close living relatives to humans, the safety and function of human iNECs can fully be tested and evaluated by cell-transplantation into non-human primate disease models. Thus, the research of non-human primates is one of the most effective approaches that promote the clinical therapy of human iNECs.

收稿日期: 2017-05-08 接受日期: 2017-08-01

国家自然科学基金(批准号: 31360231)和云南省应用基础研究计划(批准号: 2014FC004)资助的课题

*通讯作者. Tel: 0871-65952872, E-mail: litq@lpbr.cn

Received: May 8, 2017 Accepted: August 1, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31360231) and Yunnan Applied Basic Research Projects (Grant No.2014FC004)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65952872, E-mail: litq@lpbr.cn

网络出版时间: 2017-10-30 11:56:09 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20171030.1156.004.html>

Keywords primate; induced neuroepithelial stem cells; non-transgenic methods; autograft; clinical translation

神经性疾病和神经损伤日趋普遍和严重, 然而到目前为止, 依然缺乏有效的治疗方法。神经上皮干细胞(neuroepithelial stem cells, NESCs)是最早期的神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 对神经管的发育和闭合起着决定性作用^[1-2], 在神经性疾病和神经损伤的治疗中具有广阔的应用前景。利用体外培养的正常NESCs替代患者体内衰老、受损或死亡的神经细胞, 将是治疗神经性疾病和神经损伤的重要手段。

最近几年, 转分化技术在神经科学领域取得了一系列重要的突破性进展。多个实验室通过不同的方法, 成功地将小鼠、猴子和人等不同物种的体细胞直接转分化为诱导神经干细胞(induced neural stem cells, iNSCs)、诱导神经祖细胞(induced neural progenitor cells, iNPCs)和诱导神经元(induced neurons, iNs)等多种类型的神经细胞^[3-17], 为神经性疾病和神经损伤的治疗带来了新的希望。相比其他类型的诱导神经细胞, 诱导神经上皮干细胞(induced neuroepithelial stem cells, iNESCs)在增殖能力、分化潜能、基因编辑和细胞治疗等方面具有独特的优势。我们将猕猴体细胞直接转分化为功能性的iNESCs^[18], 是第一次通过转分化技术获得灵长类物种的iNESCs。与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)分化而来的NESCs相比, iNESCs可以实现疾病的个性化治疗, 从而降低机体的免疫排斥反应^[18-19]。与诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)分化而来的NESCs相比, iNESCs的获得更为简单省时, 同时也更为安全高效^[18,20]。所以, 在猕猴iNESCs研究的基础上, 进一步获得人的功能性iNESCs, 将为细胞自体移植治疗神经性疾病和神经损伤奠定基础^[18]。

然而, 由于目前只能通过外源转录因子的过表达来诱导产生灵长类的iNESCs, 所以其安全性存在未知的风险。近年来, 大量的研究表明, 小分子化合物、3D微环境、压力刺激、旁分泌作用、生长因子和细胞因子等能有效促进细胞的重编程和转分化^[12-17,21-29], 这些化学或物理的方法, 通过对细胞信号通路、表观遗传修饰、细胞骨架和细胞代谢等的调控从而实现体细胞的重编程或转分化, 相比外源

基因的过表达, 上述方法无需将外源基因导入受体细胞, 对于临床转化而言更为安全。因此, 采用非外源基因导入法将体细胞转分化为iNESCs, 将是实现iNESCs临床转化的关键。

当前, iNESCs的临床转化主要面临两个挑战: (1)在无外源基因导入条件下, 如何采用更安全的方法获得包括人在内的灵长类iNESCs; (2)如何测试iNESCs在体内的安全性和有效性。目前大多数iNSCs、iNPCs和iNs的研究, 都没有进行体内的功能性和安全性试验, 有些研究虽然做了体内试验, 但却选用小鼠等啮齿类动物作为研究对象^[9-10]。然而, 包括人在内的灵长类与啮齿类动物在进化上存在巨大的物种差异^[30-34], 所以通过啮齿类动物研究获得的实验结果很难推广及人并最终实现临床转化。非人灵长类动物在神经系统方面与人高度相似, 通过对非人灵长类动物的研究, 评估和测试iNESCs在体内的安全性和有效性, 将是推动人iNESCs进入临床转化更有效的方法。

1 灵长类iNESCs的应用前景

灵长类NSCs可以从特定脑区直接分离培养获得^[35], 但对于临床治疗而言, 这存在明显的局限性, 不可能从患者脑中取出特定脑区的组织进行NSCs的分离和培养。虽然可以从流产胎儿或器官捐献者中分离和培养NSCs, 但这不仅涉及到一系列的伦理和法律问题, 而且在实际操作中也存在较大难度。

ESCs起源于着床前囊胚的内细胞团, 能够分化产生机体的所有细胞类型, 体外培养过程中具有自我更新和无限增殖能力^[36]。人ESCs体外的成功分离和培养虽然解决了NSCs来源受限的问题^[19], 但因为起源于胚胎, 所以涉及伦理问题。此外, 通过人ESCs分化获得的NSCs对于临床患者而言, 属于异体来源的细胞, 而免疫排斥一直是细胞和器官异体移植治疗的最大障碍, 所以人ESCs的临床转化存在其自身的局限性。相对异体移植, 自体移植是克服机体免疫排斥反应最好的方法。iPSCs与ESCs拥有相似的细胞属性, 同样能够分化为机体的所有细胞类型, 体外培养过程中具有自我更新和无限增殖能力。iPSCs的起源无需使用胚胎, 可以通过体细胞直接重

编程获得^[37], 这克服了ESCs所涉及的伦理问题。更为重要的是, iPSCs可以利用患者的体细胞诱导重编程获得, 从而实现疾病的个性化治疗, 最大程度地克服了异体移植带来的免疫排斥问题。因此, iPSCs的出现开辟了细胞自体移植治疗的新希望, 在再生医学领域拥有广阔的应用前景。为此, 日本科学家Yamanaka获得了2012年的诺贝尔生理学或医学奖。但从iPSCs到NSCs或NPCs, 需要经过从体细胞重编程为iPSCs后再进一步分化为NSCs或NPCs的一系列复杂而耗时的过程^[20]。到目前为止, 人iPSCs的重编程效率依然较低, 耗时也较长, 从iPSCs分化为NSCs或NPCs的过程也比较繁琐。更为重要的是, 潜在的致瘤风险使得iPSCs真正进入临床治疗依然任重道远。从体细胞直接转分化为iNSCs或iNPCs可以在较短时间内一步完成, 能有效克服iPSCs繁琐的重编程和分化过程^[9-10,18]。

NSCs随着脑的发育过程, 主要经历两个重要的阶段: 即NESCs和放射胶质前体细胞(radial glial progenitor cells, RGPCs)。NESCs是最早期的NSCs, 发生在神经管阶段, 具有很强的增殖能力和分化潜能, 体外长期培养过程中能够保持稳定的细胞特性, 能分化为整个脑区各种神经终末端的功能细胞。相比而言, RGPCs是神经管闭合后的NSCs, 具有有限的增殖能力和分化潜能, 在体外长期培养过程中很难保持稳定的细胞特性。NPCs是一类更为晚期的神经细胞, 具有特定的脑区域性, 分化程度更高, 能产生的终末端神经细胞种类更少, 体外长期培养过程中的细胞稳定性、增殖能力和分化潜能均较差^[9-10,38-40]。

转分化来源的iNESCs与ESCs或iPSCs分化而来的NESCs拥有相似的细胞增殖能力和分化潜能, 体外单细胞或多细胞培养过程中均能自发极化形成神经管样的结构, 可以模拟胚胎早期神经管的发育, 是研究神经管发育缺陷比较好的细胞模型^[18,40]。因此, 通过体细胞直接转分化获得iNESCs拥有独特的优势, 相比其他类型的细胞, 具有重要科研价值的同时, 还拥有更为广阔的临床应用前景。一方面, iNESCs能够在体外进行大量扩增, 分化为各种神经终末端的功能细胞, 可以为治疗相关神经性疾病和神经损伤提供足够的细胞数量; 另一方面, iNESCs的获得方法简单, 周期短, 诱导效率高且安全性好, 通过细胞自体移植, 能最大限度地降低宿主的免疫排斥反应, 进而促进干细胞技术在神经性疾病和神

经损伤中的个性化治疗。

2 灵长类iNESCs的研究进展

iPSCs重编程技术的出现, 推动了体细胞转分化研究的快速发展。过去几年, 转分化研究取得了许多突破性进展。直接通过体细胞, 已成功实现了具有临床治疗前景的胰岛 β 细胞、神经元、心肌细胞和肝细胞等的转分化^[41-46], 为糖尿病、神经性疾病和损伤、心脏病和肝病等的细胞替代治疗开拓了新的途径。

由于神经元属于终末端细胞, 不具增殖能力从而无法满足移植治疗所需要的细胞数量。此外, 神经元在体外培养过程中比较脆弱, 容易凋亡。所以, 通过转分化体细胞获得具有增殖能力和分化潜能的iNSCs对于临床治疗显得尤其重要。将小鼠成纤维细胞转分化为iNSCs或iNPCs已取得了重要的进展^[3-6], 在此基础上, 通过转分化包括人在内的灵长类体细胞, 也成功获得了iNSCs或iNPCs^[7-12], 为干细胞治疗神经性疾病和损伤提供了广阔的前景。我们的研究直接将猕猴的成纤维细胞转分化最早期的NSCs, 即iNESCs^[18], 这些iNESCs具有典型的神经上皮干细胞的特性, 能分化产生高比例的神经元, 可实现单个iNESC的克隆扩增, 体外培养过程中能发育为微型的神经管样结构。最为重要的是, 当这些iNESCs在体外进行分化处理5天后移植到猕猴的脑部, 细胞能够很好地整合到大脑皮层以及纹状体区域, 并分化为大脑皮层和纹状体神经元, 再生出神经突触, 再生的神经轴突能够被体内的少突胶质细胞髓鞘化, 与受体神经元形成突触性连接^[18]。

遗憾的是, 包括我们的研究在内, 当前大部分的iNSCs或iNPCs都是通过外源基因的过表达诱导产生的, 这对于神经性疾病和神经损伤治疗而言存在未知的安全风险, 不利于临床转化的推广。因此, 采用更安全的非外源基因导入法将体细胞直接转分化为iNESCs, 最终产生功能性神经元无疑是促进干细胞临床转化的关键。可喜的是, 在无外源基因导入的条件下, 最近体细胞直接转分化为iNs和iNPCs取得了一些重要的进展^[12-17]。但体外培养的iNs由于自身的缺陷而无法达到移植治疗所需要的细胞数量和质量(表1)。同iNESCs相比, iNPCs的增殖能力、分化潜能、单细胞克隆扩增能力和体外培养过程中细胞的稳定性都较差(表1)。另外, 对于基因突

表1 灵长类不同类型诱导神经细胞获得方法及特性的比较

Table 1 The comparison of induction methods and cellular properties among various primate induced neural cells				
细胞类型	诱导神经上皮干细胞 ^[18]	诱导放射胶质前体细胞	诱导神经祖细胞 ^[7-12]	诱导神经元 ^[13-16,42-43]
Cell types	iNEsCs ^[18]	Induced RGPCs	iNPCs ^[7-12]	iNs ^[13-16,42,43]
Induction methods	Introduce exogenous genes (safety risks)	No reports	Introduce exogenous genes (safety risks)	Introduce exogenous genes (safety risks)
			Chemical conversing (safer)	Chemical conversing (safer)
Differentiation potential	Almost all neural cells		Region-restrictive neural cells	No potential
Cellular properties <i>in vitro</i>	Stable		Instable	Instable
Gene editing	Easy		Difficult	Very difficult
Single cell clonogenicity	High		Low	Hardly survive
Self-renewal	Rapid		Slow	Incapable

变(特别是家族式遗传疾病)的临床患者, 需要采用CRISPR/Cas9或TALENs等基因编辑技术, 对细胞进行基因修复。因此, 转分化获得的细胞是否易于进行基因编辑操作, 并通过单细胞克隆扩增的方法筛选出基因成功修复且没有脱靶的细胞, 这是一个重要的问题。相比iNPCs, iNEsCs具有不可替代的优势, 易于体外单细胞克隆扩增和进行基因编辑等操作, 且能稳定保持细胞自身的特性(表1)^[18]。因此, 将体细胞直接转分化为易于进行基因编辑的、具有很强增殖能力和稳定细胞特性的iNEsCs, 是转分化的神经细胞能够进入临床转化和应用的关键。然而到目前为止, 在无外源基因导入条件下, 尚没有直接转分化灵长类体细胞获得iNEsCs的研究报道。所以, 探索无外源基因导入条件下获得灵长类iNEsCs的新方法, 对再生医学而言意义重大。

3 无外源基因导入条件下获得灵长类iNEsCs的策略

最近大量的研究表明, 小分子化合物、3D微环境、压力刺激、旁分泌作用、生长因子和细胞因子等在细胞重编程或转分化的过程中起着重要作用^[12-17,21-29], 为无外源基因导入条件下实现灵长类iNEsCs的转分化提供了新的研究思路(图1)。

3.1 小分子化合物

无需外源基因的过表达, 仅通过小分子化合物的作用就可以将小鼠成纤维细胞重编程为iPSCs的研究^[21-22], 开启了小分子化合物在重编程和转分化研究中的热潮。通过小分子化合物可以直接将小鼠和人的体细胞转分化为功能性的iNs和iNPCs^[12-16]。这些研究表明, 在没有外源基因过表达的条件下, 通过小分子化合物对细胞相关信号通路的调节, 就可以

实现细胞命运的转变。我们之前的研究证实, Wnt、Notch、FGF和Stat3/JAK信号通路的激活、TGF-β和BMP信号通路的抑制, 有利于灵长类NEsCs的干性维持和自我更新^[18,39-40]。所以, 通过不同小分子化合物的组合实现相关信号通路的激活和抑制, 从而开启NEsCs特有的转录调控网络, 将是实现灵长类体细胞转分化为iNEsCs的重要途径。

3.2 3D微环境

近年来, 基质胶(matrigel)、水凝胶和胶原等多种胞外基质材料的快速发展, 大大促进了三维(three dimensions, 3D)立体培养在哺乳动物干细胞和组织器官再生中的应用。3D基质材料在细胞或组织器官生长中不仅能够起到支架的作用, 还能很好地模拟体内独特的微环境(niche), 提供细胞更好的生长空间、改变细胞间相互作用和通讯方式, 甚至会通过影响细胞骨架进而改变细胞的形态特征。基质胶和水凝胶独特的3D微环境能有效提高iPSCs重编程的效率以及速度^[23]。最近的研究发现, 在小鼠成纤维细胞转分化为iNPCs的过程中, 迫使早期的细胞不能贴壁单层生长, 而是成球(sphere)生长, 再借助一些生长因子的作用便能成功实现转分化, 这其中, 成球的细胞生长模式所提供的3D微环境起着重要的作用^[17]。

3.3 压力刺激

压力刺激(如高渗透压、饥饿、创伤和炎症反应等)能引起细胞的应激反应, 从而造成基因表达和表观遗传修饰的改变, 导致细胞的可塑性增加并促进重编程或转分化的发生。Xu等^[24]发现, 高渗透压介导的P38信号通路的激活能有效促进细胞的重编程。对细胞进行饥饿处理能显著下调哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白复合体1(mammalian target of

rapamycin complex 1, mTORC1)^[47], 而mTORC1的下调会导致细胞线粒体发生重构, 从而促进细胞重编程^[48]。最新研究发现, 饥饿处理能使丧失功能的胰腺细胞发生重编程而再生出功能性胰岛 β 细胞, 从而替换受损的 β 细胞并使胰腺重新恢复正常功能^[25]。Lee等^[26]的研究表明, Poly I:C引起的炎症反应通过激活Toll样受体3(toll-like receptor 3, TLR3), 快速诱导细胞的表观遗传修饰发生改变, 使染色质结构重塑, 进而促进细胞的重编程。在人和小鼠的创伤愈合过程中, 伤口通过激活BMP-ZFP423信号通路, 可以将肌成纤维细胞转分化为脂肪细胞以帮助伤口愈合而不会形成疤痕^[27]。上述研究表明, 压力刺激引起的应激反应, 在细胞重编程和转分化过程中发挥着积极的作用。

3.4 旁分泌作用、生长因子和细胞因子

衰老或损伤的细胞分泌的IL-6能促进并显著提高周围细胞的重编程效率, 从而有助于受损组织的修复和再生^[28-29], 这说明细胞因子IL-6能够促进细胞重编程, 同时也揭示了旁分泌作用及其细胞所处的微环境对自身的命运具有重要影响。我们前期的研究发现, 生长因子LIF和bFGF在转录因子的介导下能有效促进猕猴的体细胞转分化为iNESC^s^[18]。最新研究表明, 无需任何外源基因和小分子化合物的参与, 仅通过LIF、bFGF和EGF这三个生长因子, 辅以特殊的细胞培养方法(诱导过程中让细胞聚集成球生长)就能将小鼠的成纤维细胞转分化为iNPC^s, 但遗憾的是, 该研究使用同样的方法却无法将人的成

纤维细胞转分化为iNPC^s^[17]。这表明, 在转分化过程中, 啮齿类动物细胞和包括人在内的灵长类动物细胞存在明显的物种差异。和iPSC^s的重编程一样, 显然灵长类动物细胞的转分化更为困难。所以, 要成功实现灵长类体细胞转分化为功能性iNESC^s, 在借鉴啮齿类动物细胞转分化的同时, 必须采取更为有效的方法。

3.5 其他方法

我们的前期研究发现, 表观遗传修饰在iNESC^s的转分化过程中扮演着极其重要的角色。丙戊酸(valproic acid, VPA)通过抑制组蛋白去乙酰基酶的活性从而促进组蛋白的乙酰化, 使得细胞在重编程和转分化过程中, 组蛋白呈现出比较松散的状态进而有利于相关转录因子与DNA的结合与绑定, 最终促进重编程和转分化的发生^[12-13,16,18,49-50]。Vc具有很好的抗氧化功能, 能有效减缓氧自由基对细胞造成的氧化损伤, 同时, Vc还能将细胞的5-甲基胞嘧啶催化为5-羟甲基胞嘧啶, 从而实现DNA的去甲基化^[51-52]。已有研究表明, Vc能够显著提高iPSC^s的重编程效率^[53], 并能促进猕猴成纤维细胞转分化为iNESC^s^[18]。

叶酸在神经管的发育过程中扮演着关键角色, NESC^s在自我更新过程中, 叶酸代谢至关重要, 我们前期的研究发现, 叶酸的缺乏严重影响NESC^s的自我更新和形成神经管样结构的能力^[40]。烟酰胺具有抗氧化和抗衰老的功能, 能够有效清除细胞中的氧自由基, 减少细胞的氧化损伤, 已有研究表明,

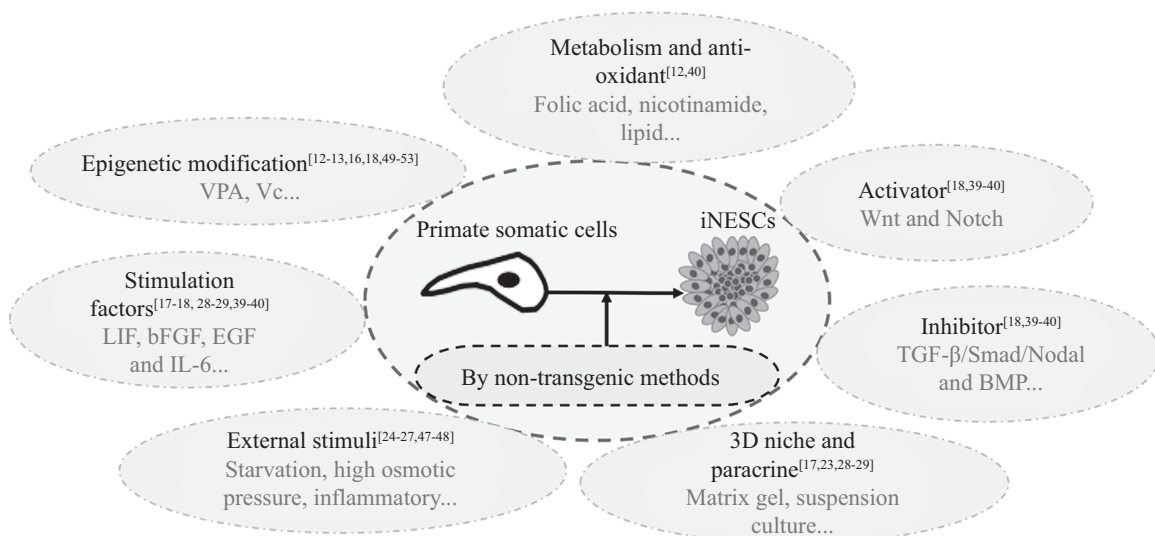


图1 无外源基因导入条件下灵长类iNESC^s的诱导策略

Fig.1 Conversion of primate somatic cells to iNESC^s by non-transgenic methods

低氧环境能有效促进iNPCs的转分化^[12]。我们前期的研究发现, 灵长类的NESC_s具有很强的脂质代谢功能, 提示脂质成分在NESC_s培养体系中可能起着关键作用^[40]。所以, 在培养液中添加适量的叶酸、烟酰胺和脂质, 可能会促进灵长类iNESC_s的转分化进程。

4 非人灵长类的研究促进iNESC_s临床转化

和药物一样, iNESC_s进入临床转化前, 必须通过严格的安全性和有效性评估。安全性主要考虑移植后, iNESC_s在体内是否会异常增殖甚至产生肿瘤, 是否会引起宿主的免疫排斥反应和炎性反应等。有效性主要考虑移植后, iNESC_s在体内是否能正常存活、分化、迁移并与宿主本身的细胞发生整合和功能性连接, 是否对相关神经性疾病和神经损伤的症状有明显改善。此外, iNESC_s移植前的处理以及移植的部位等都需要经过大量的实验去探索, 最终才能寻找到iNESC_s最好的移植方案。所有这些在进入临床转化前, 只能通过动物模型去测试和验证。

遗憾的是, 过去很长一段时间, 干细胞在体内的安全性和有效性没有得到足够的重视。

当前绝大多数关于iNESC_s或iNPCs的研究, 其重心都放在培养体系、信号通路、转录调控和表观遗传修饰等体外水平的探索上, 少数研究虽做了体内功能和安全性的测试, 但限于实验条件只能选用小鼠等啮齿类动物作为研究对象^[9-10]。然而, 包括人在内的灵长类与小鼠等啮齿类动物存在的巨大物种差异^[30-34], 必然导致通过啮齿类动物研究获得的很多实验结果在临床实验中出现偏差, 甚至呈现相反的结果, 最终造成很多研究成果不能推广及人, 这浪费大量人力物力的同时也阻碍了干细胞的临床转化进程。

相比啮齿类动物, 非人灵长类在脑的发育、结构、功能和生理特征方面与人高度相似。我们的研究也表明, 非人灵长类的NESC_s特性与人的NESC_s极为相似^[39-40], 所以, 非人灵长类模型是探索iNESC_s在体内的安全性和有效性最好的实验动物。长期以来, 新药研发的失败率极高, 成本居高不下, 严重阻碍了医药产业的发展。大规模的使用啮齿类动物模型用于药物前期的研发和测试, 是造成这一局面的重要原因^[54]。在治疗阿尔茨海默氏症的药物研发过程中, 辉瑞和强生的bapineuzumab以及礼来的Solanezumab最终被宣告失败, 这些都是比较惨痛的

教训。因此, 在探索iNESC_s在体内的安全性和有效性时, 必须吸取新药研发过程中所经历的教训, 选用与人类拥有最近亲缘关系的非人灵长类动物模型进行实验和测试。

当前, 中国拥有丰富的猕猴和食蟹猴等非人灵长类动物资源, 而且在猕猴和食蟹猴的饲养规模、基因编辑、疾病模型和干细胞等研究中都处于世界领先地位^[18,55-58]。最近, 我国的研究人员通过基因编辑技术建立非人灵长类动物模型又取得了新的突破。昆明理工大学的季维智团队^[59]通过基因编辑技术首次获得了表型明显的自闭症食蟹猴。中国科学院的杨辉团队^[60]通过优化的CRISPR技术, 实现了一步法获得目的基因完全敲除的食蟹猴。这两个研究对未来通过基因编辑方法建立稳定的非人灵长类动物模型将会有深远的影响。随着国家对非人灵长类动物研究的重视, 在即将实施的“中国脑计划”中, 非人灵长类动物必将扮演着重要角色。因此, 人们首先通过转分化技术获得非人灵长类动物疾病模型的iNESC_s(若动物疾病模型存在基因突变, 则结合基因编辑技术对iNESC_s进行基因修复), 并对模型进行iNESC_s自体移植治疗。然后, 在不同时间点详细追踪及分析iNESC_s在体内的存活、分化、迁移及其与宿主神经细胞的整合与功能性连接情况的同时, 观察模型是否发生免疫排斥和炎性反应、症状是否改善以及移植的iNESC_s在体内是否异常增殖甚至产生肿瘤, 进而评价非人灵长类iNESC_s自体移植的安全性和功能作用。在此基础上, 优化iNESC_s移植前的处理方法、移植的细胞数量、移植的时间窗口以及移植的部位等, 建立一套易于操作、行之有效的iNESC_s的移植操作规范。

通过非人灵长类iNESC_s的自体移植, 确定其安全性和有效性后, 进一步将人的iNESC_s(结合基因编辑技术实现基因修复)移植到相关神经性疾病和神经损伤的非人灵长类动物模型, 评估人的iNESC_s在非人灵长类动物体内的安全性和有效性。经过上述实验的严格测试和论证, 将为人的iNESC_s最终进入临床、实现神经性疾病和神经损伤的个性化治疗奠定坚实的基础, 如图2所示。

5 结论与展望

最近几年, iNESC_s的研究取得了重要的进展, 为神经性疾病和神经损伤的个性化治疗奠定了重

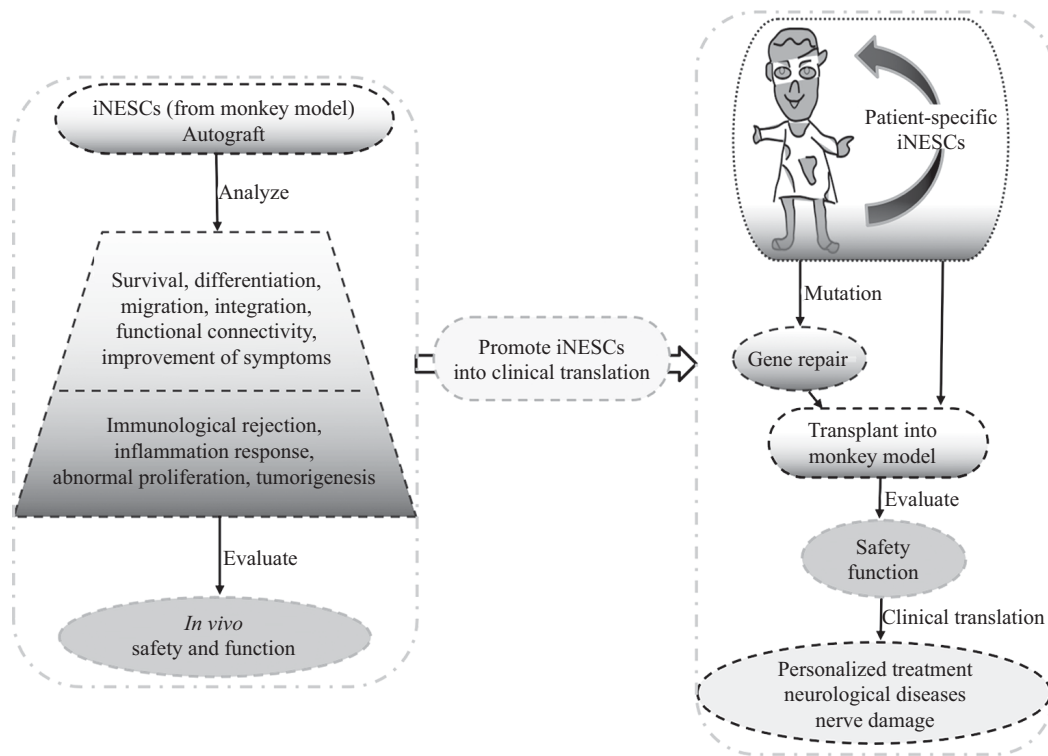


图2 非人灵长类的研究促进iNECs的临床转化

Fig.2 Study in non-human primates promote the clinical translation of iNECs

要基础。然而到目前为止, 在无外源基因导入条件下, 如何将包括人在内的灵长类体细胞转分化为iNECs仍然面临不小的挑战。最近关于小分子化合物(相关信号通路的激动剂或抑制剂)、3D微环境、压力刺激、旁分泌作用、生长因子和细胞因子等在体细胞重编程和转分化中的系列研究进展, 为无外源基因导入条件下实现灵长类iNECs的转分化提供了重要的参考和新的研究思路。

以猕猴和食蟹猴为代表的非人灵长类动物与人类拥有相近的亲缘关系, 其神经系统与人类高度相似。因此, 借助猴模型, 追踪和评估iNECs在体内的安全性和功能作用, 将是推动人iNECs最终进入临床转化最为有效的方法。当前, 中国在非人灵长类动物的研究中虽然拥有独特的优势并处于世界领先水平, 但也面临两个重要的难题: (1)以猕猴和食蟹猴为代表的非人灵长类动物, 无论是动物购买价格还是饲养成本, 都远高于啮齿类动物, 导致大部分研究人员和科研单位无力承担其高昂的研究费用; (2)中国虽然在非人灵长类动物模型的研究中取得了许多突破性进展, 然而到目前为止, 对于大多数神经性疾病和神经损伤而言, 依然缺乏有效的非人灵长类模型。随着国家加大对非人灵长类动物研究

的支持以及基因编辑技术、多能干细胞技术和动物克隆技术的发展, 相信这两个难题有望在短期内得到解决。

在中国脑计划即将推出之际, 我们有必要加大对包括人在内的灵长类iNECs的研究力度。尽快探索出更安全的灵长类iNECs的获得方法, 同时借助非人灵长类动物模型, 详细论证iNECs在体内的安全性和有效性, 从而在世界范围内率先获得临床级的功能性iNECs, 奠定我国在该领域领先地位的同时, 也造福世界各地的神经性疾病和神经损伤的患者。

参考文献 (References)

- 1 Davignon RW, Parker RM, Hendrickx AG. Staging of the early embryonic brain in the baboon (*Papio cynocephalus*) and rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Anat Embryol (Berl)* 1980; 159(3): 317-34.
- 2 Bush KT, Lynch FJ, DeNittis AS, Steinberg AB, Lee HY, Nagele RG. Neural tube formation in the mouse: a morphometric and computerized three-dimensional reconstruction study of the relationship between apical constriction of neuroepithelial cells and the shape of the neuroepithelium. *Anat Embryol (Berl)* 1990; 181(1): 49-58.
- 3 Kim J, Efe JA, Zhu S, Talantova M, Yuan X, Wang S, *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors.

- Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(19): 7838-43.
- 4 Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T, *et al.* Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 473-9.
- 5 Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(7): 2527-32.
- 6 Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Hoing S, Arauzo-Bravo MJ, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012; 10(4): 465-72.
- 7 Ring KL, Tong LM, Balestra ME, Javier R, Andrews-Zwilling Y, Li G, *et al.* Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* 2012; 11(1): 100-9.
- 8 Kumar A, Declercq J, Eggermont K, Agirre X, Prosper F, Verfaillie CM. Zic3 induces conversion of human fibroblasts to stable neural progenitor-like cells. *J Mol Cell Biol* 2012; 4(4): 252-5.
- 9 Lu J, Liu H, Huang CT, Chen H, Du Z, Liu Y, *et al.* Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts. *Cell Rep* 2013; 3(5): 1580-91.
- 10 Wang L, Wang L, Huang W, Su H, Xue Y, Su Z, *et al.* Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods* 2013; 10(1): 84-9.
- 11 Zou Q, Yan Q, Zhong J, Wang K, Sun H, Yi X, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts into neuronal restricted progenitors. *J Biol Chem* 2014; 289(8): 5250-60.
- 12 Cheng L, Hu W, Qiu B, Zhao J, Yu Y, Guan W, *et al.* Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res* 2014; 24(6): 665-79.
- 13 Hu W, Qiu B, Guan W, Wang Q, Wang M, Li W, *et al.* Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 204-12.
- 14 Li X, Zuo X, Jing J, Ma Y, Wang J, Liu D, *et al.* Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 195-203.
- 15 Zhang L, Yin JC, Yeh H, Ma NX, Lee G, Chen XA, *et al.* Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17(6): 735-47.
- 16 Gao L, Guan W, Wang M, Wang H, Yu J, Liu Q, *et al.* Direct generation of human neuronal cells from adult astrocytes by small molecules. *Stem Cell Reports* 2017; 8(3): 538-47.
- 17 Gao R, Xiu W, Zhang L, Zang R, Yang L, Wang C, *et al.* Direct induction of neural progenitor cells transiently passes through a partially reprogrammed state. *Biomaterials* 2017; 119: 53-67.
- 18 Ai Z, Xiang Z, Li Y, Liu G, Wang H, Zheng Y, *et al.* Conversion of monkey fibroblasts to transplantable telencephalic neuroepithelial stem cells. *Biomaterials* 2016; 77: 53-65.
- 19 Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, *et al.* Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(12): 1134-40.
- 20 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 2009; 27(3): 275-80.
- 21 Zhao Y, Zhao T, Guan J, Zhang X, Fu Y, Ye J, *et al.* A XEN-like state bridges somatic cells to pluripotency during chemical reprogramming. *Cell* 2015; 163(7): 1678-91.
- 22 Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, *et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013; 341(6146): 651-4.
- 23 Caiazzo M, Okawa Y, Ranga A, Piersigilli A, Tabata Y, Lutolf MP. Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency. *Nat Mater* 2016; 15(3): 344-52.
- 24 Xu X, Wang Q, Long Y, Zhang R, Wei X, Xing M, *et al.* Stress-mediated p38 activation promotes somatic cell reprogramming. *Cell Res* 2013; 23(1): 131-41.
- 25 Cheng CW, Villani V, Buono R, Wei M, Kumar S, Yilmaz OH, *et al.* Fasting-mimicking diet promotes Ngn3-driven beta-cell regeneration to reverse diabetes. *Cell* 2017; 168(5): 775-88.
- 26 Lee J, Sayed N, Hunter A, Au KF, Wong WH, Mocarski ES, *et al.* Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* 2012; 151(3): 547-58.
- 27 Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, Li YR, Dedhia PH, Zheng Y, *et al.* Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* 2017; 355(6326): 748-52.
- 28 Chiche A, Le Roux I, von Joest M, Sakai H, Aguin SB, Cazin C, *et al.* Injury-induced senescence enables *in vivo* reprogramming in skeletal muscle. *Cell Stem Cell* 2016; 20: 1-8.
- 29 Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marion RM, Chondronasiou D, Rovira M, *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming *in vivo*. *Science* 2016; 354(6315): aaf4445.
- 30 Florio M, Huttner WB. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* 2014; 141(11): 2182-94.
- 31 Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 2010; 464(7288): 554-61.
- 32 Ju XC, Hou QQ, Sheng AL, Wu KY, Zhou Y, Jin Y, *et al.* The hominoid-specific gene TBC1D3 promotes generation of basal neural progenitors and induces cortical folding in mice. *Elife* 2016; 9: 5.
- 33 Pollen AA, Nowakowski TJ, Chen J, Retallack H, Sandoval-Espinosa C, Nicholas CR, *et al.* Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell* 2015; 163(1): 55-67.
- 34 Taverna E, Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 465-502.
- 35 Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(26): 14720-5.
- 36 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 37 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 38 Li W, Sun W, Zhang Y, Wei W, Ambasadhan R, Xia P, *et al.* Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural

- precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(20): 8299-304.
- 39 Zhu X, Ai Z, Hu X, Li T. Efficient Generation of corticofugal projection neurons from human embryonic stem cells. *Sci Rep* 2016; 6: 28572.
 - 40 Zhu X, Li B, Ai Z, Xiang Z, Zhang K, Qiu X, *et al.* A Robust single primate neuroepithelial cell clonal expansion system for neural tube development and disease studies. *Stem Cell Reports* 2016; 6(2): 228-42.
 - 41 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.
 - 42 Pang ZP, Yang N, Vierbuchen T, Ostermeier A, Fuentes DR, Yang TQ, *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 2011; 476(7359): 220-3.
 - 43 Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 2011; 476(7359): 224-7.
 - 44 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
 - 45 Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, *et al.* Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3): 215-22.
 - 46 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
 - 47 Carroll B, Maetzel D, Maddocks OD, Otten G, Ratcliff M, Smith GR, *et al.* Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *Elife* 2016; 7: 5.
 - 48 Wu Y, Li Y, Zhang H, Huang Y, Zhao P, Tang Y, *et al.* Autophagy and mTORC1 regulate the stochastic phase of somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol* 2015; 17(6): 715-25.
 - 49 Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
 - 50 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1269-75.
 - 51 Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martinez JA, Goyal P, Mahapatra S, *et al.* Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 2013; 500(7461): 222-6.
 - 52 D'Aniello C, Habibi E, Cermola F, Paris D, Russo F, Fiorenzano A, *et al.* Vitamin C and L-Proline antagonistic effects capture alternative states in the pluripotency continuum. *Stem Cell Reports* 2017; 8(1): 1-10.
 - 53 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(1): 71-9.
 - 54 Hayden EC. Misleading mouse studies waste medical resources. *Nature news*, 26 March 2014.
 - 55 Cyranoski D. Monkey kingdom. *Nature* 2016; 532(7599): 300-2.
 - 56 Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156(4): 836-43.
 - 57 Liu Z, Li X, Zhang JT, Cai YJ, Cheng TL, Cheng C, *et al.* Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* 2016; 530(7588): 98-102.
 - 58 Chen Y, Niu Y, Li Y, Ai Z, Kang Y, Shi H, *et al.* Generation of cynomolgus monkey chimeric fetuses using embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1): 116-24.
 - 59 Chen Y, Yu J, Niu Y, Qin D, Liu H, Li G, *et al.* Modeling rett syndrome using TALEN-Edited MECP2 mutant cynomolgus monkeys. *Cell* 2017; 169(5): 945-55.
 - 60 Zuo E, Cai YJ, Li K, Wei Y, Wang BA, Sun Y, *et al.* One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Res* 2017; 27(7): 933-45.