



中枢神经原位再生技术及其治疗前景

王青松^{1†}, 李雯^{1†}, 雷文亮^{1†}, 陈蔚祎¹, 郑嘉骏¹, 项宗勤², 刘敏慧¹, 何情¹,
徐亮¹, 李智飞², 王陶¹, 吴政^{1*}, 陈功^{1*}

1. 暨南大学粤港澳中枢神经再生研究院, 广州 510632;

2. 暨南大学附属第一医院神经外科系, 广州 510632

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: zhengwu@jnu.edu.cn; gongchen@jnu.edu.cn

收稿日期: 2021-01-27; 接受日期: 2021-04-12; 网络版发表日期: 2021-06-07

国家自然科学基金(批准号: U1801681, 31970906, 31701291)、广东省重点领域研发计划(批准号: 2018B030332001)和广东省自然科学基金(批准号: 2020A1515011079, 2020A1515010854)资助

摘要 中枢神经再生长期以来一直是成年哺乳类动物大脑损伤或者发生退行性病变后悬而未决的世界性难题. 在过去的数十年里, 干细胞疗法在神经再生领域取得了一系列成果, 同时也遇到了重大挑战. 近些年兴起的中枢神经原位再生技术利用内源性的胶质细胞可以自我分裂再生的特点, 通过表达神经转录因子或其他方法将胶质细胞原位转化为功能性神经元, 避免了建立体外干细胞库的高成本和外源细胞移植的问题. 本文总结了目前国内运用体内胶质细胞进行原位神经再生的前沿进展, 着重介绍了中枢神经原位再生技术在治疗重大脑疾病, 包括脑卒中、阿尔茨海默症、帕金森病、亨廷顿舞蹈症以及视觉系统疾病和脊髓损伤等方面的潜在应用前景. 虽然该技术还处在摇篮阶段, 并且像任何新技术一样都有它自身的局限性, 但是本团队在灵长类脑卒中模型上已经证明了中枢神经原位再生的可行性, 为将来进一步的临床研究开辟了一条新途径.

关键词 中枢神经系统, 神经再生, 脑卒中, 阿尔茨海默症, 帕金森病, 亨廷顿舞蹈症, 视觉系统疾病, 脊髓损伤, 胶质瘤

随着全球人口老龄化进程的加速发展, 脑卒中(stroke)、阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)和脑胶质瘤等中枢神经系统疾病呈现不断攀升的趋势. 目前, 中枢神经系统疾病已经是全球范围内首要的致残因素, 也是全世界第二大致死因素. 过去30年间, 死于中枢神经系统疾病的患者人数增加了39%^[1]. 中枢神经系统疾病造成的社会经济损失巨大, 常占到全社会医疗卫生和护理

开支的50%以上. 仅在美国和欧洲, 中枢神经系统疾病造成的经济损失已经分别超过了每年8000亿美元和8000亿欧元^[2~4].

当前的神经相关药物治疗法仅能缓解部分病人的症状, 或延缓病程发展, 尚无法根本治愈中枢神经系统的疾病和损伤. 例如, 治疗缺血性卒中的组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA), 治疗AD的胆碱酯酶抑制剂、NMDA(N-methyl-D-aspartate)受体拮

引用格式: 王青松, 李雯, 雷文亮, 等. 中枢神经原位再生技术及其治疗前景. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1426–1445
Wang Q S, Li W, Lei W L, et al. *In situ* neuroregeneration: frontiers and therapeutic prospects (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2022, 52: 1426–1445, doi: 10.1360/SSV-2021-0024

抗剂和甘露寡糖二酸(GV-971), 治疗PD的左旋多巴、多巴胺受体激动剂和单胺氧化酶抑制剂等都是缓解类药物, 不是治愈类药物。另外, 当今的基因疗法仅对一小部分单基因突变引起的疾病具有显著疗效。例如, *SMN1*基因修正疗法治疗脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA), 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的*RPE65*基因表达治疗突变相关性视网膜营养不良等。其他类型的疗法, 例如, 治疗脑卒中的机械溶栓/止血和系统性康复训练, 治疗PD的深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS)等, 亦不能有效逆转中枢神经系统疾病和损伤的发展和恶化^[5-10]。归根结底, 当前治疗手段的局限性很大程度上是因为中枢神经系统神经元再生这一世界性难题未能被有效地解决^[11,12]。在过去的几十年里, 神经再生主要是通过传统的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)移植以及方兴未艾的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)、神经干细胞以及间充质干细胞移植来进行尝试的。干细胞移植在动物模型上显示出一定的神经再生潜能, 并且可以通过分泌营养因子和调节免疫反应等方式取得一些治疗效果, 但同时也面临着潜在的免疫排斥反应和成瘤风险, 以及昂贵的干细胞体外培养和长期储存体系的建立和不同批次之间的细胞稳定性等问题^[13]。

近年来, 受iPSC技术和体细胞直接重编程技术的启发, 神经生物学家开始尝试将中枢神经系统内部的非神经细胞直接重编程为各种类型的神经元, 取得了一系列突破性的进展^[11,12,14-17]。为了叙述方便, 本文将这些中枢神经系统胶质细胞重编程为神经元方面的新进展统称为中枢神经原位再生技术。该技术主要是运用bHLH(basic helix-loop-helix)家族的神转录因子, 包括NeuroD1, Neurogenin2(Ngn2)和Ascl1(achaete-scute complex-like 1)等将中枢神经系统的内源性胶质细胞直接转化为神经元^[16-33](图1)。选取胶质细胞进行神经转分化的实验是因为神经元不能分裂, 死后不能再生; 而胶质细胞可以分裂并且自我再生, 是一个天然的细胞库。此外, 在胶质细胞中下调PTBP1(polypyrimidine tract binding protein 1)的表达, 亦可以将胶质细胞原位转化为神经元^[34-36]。中枢神经原位再生技术的出现, 为众多中枢神经系统疾病的治疗开辟了全新的途径。目前, 基于转录因子或者*PTBP1*敲降的神经再生型基因疗法已经在啮齿类动物的缺血性脑卒中模

型、亨廷顿舞蹈症模型、帕金森病模型和视网膜损伤模型上取得了部分功能恢复的效果^[26,27,29,30,34,35]。同时, 本团队^[31]也成功地运用中枢神经原位再生技术在非人灵长类缺血性脑卒中模型上高效地再生出新神经元并且取得了神经组织修复的效果。本文将从重大脑疾病和脊髓损伤以及视觉系统疾病等方面介绍中枢神经原位再生技术的新进展及其潜在的应用前景。

1 脑卒中

脑卒中(也称脑中风), 是一组由脑血管堵塞或破裂造成的, 以脑组织缺血性或出血性损伤为临床表现的疾病。脑卒中是全球第三大致死疾病, 仅次于冠心病和癌症^[37]。全世界每年有超过1700万人罹患脑卒中, 其中2/3的病人最终死亡或残疾^[38]。我国每年新发脑卒中近250万例, 并且有约1242万人在经历脑卒中带来的后遗症^[39]。目前脑卒中的临床治疗主要是药物或机械溶栓、神经保护和康复训练等。卒中后神经元的大量死亡是脑功能缺失的直接原因, 而成年大脑里的神经元难以自行再生是目前脑卒中缺乏有效治疗手段的重要原因。补充脑卒中损伤区域中缺失的神经元, 进而重构神经元之间的功能连接是改善卒中症状的关键所在。目前的办法, 包括内源干细胞动员和外源干细胞移植^[11,40], 虽然有一定的临床应用潜力, 但是尚有一些瓶颈需要突破, 比如致瘤性、免疫原性和细胞代系间异质性等^[12,13,41]。因此, 探索新型的卒中治疗方法刻不容缓。

近年来, 一种全新的神经再生策略逐渐兴起。鉴于外源性干细胞移植后难以适应宿主的新环境, 且容易遭到免疫细胞攻击, 而大脑内源性干细胞又局限在很少的脑区且数量有限, 本团队和其他一些团队把目光投向了大脑内源性的胶质细胞。在哺乳类动物的大脑里, 每一个神经元都被胶质细胞紧密环绕, 并且许多胶质细胞, 如星形胶质细胞和神经元共享原始的祖细胞, 因而在发生谱系上比较接近。更重要的是, 胶质细胞可以分裂从而实现自我补充, 因此是一个取之不尽用之不竭的再生泉。利用内源性胶质细胞这些特性, 本团队^[16]在胶质细胞里引入了神经转录因子NeuroD1, 成功地将胶质细胞转化成了功能性神经元。选取NeuroD1是因为它是一种神经分化因子, 在大脑发育早期的神经干细胞中表达, 能够将神经干细胞分化为神经元。正是基于神经分化这一特性, 本团队^[16]发现, 当把

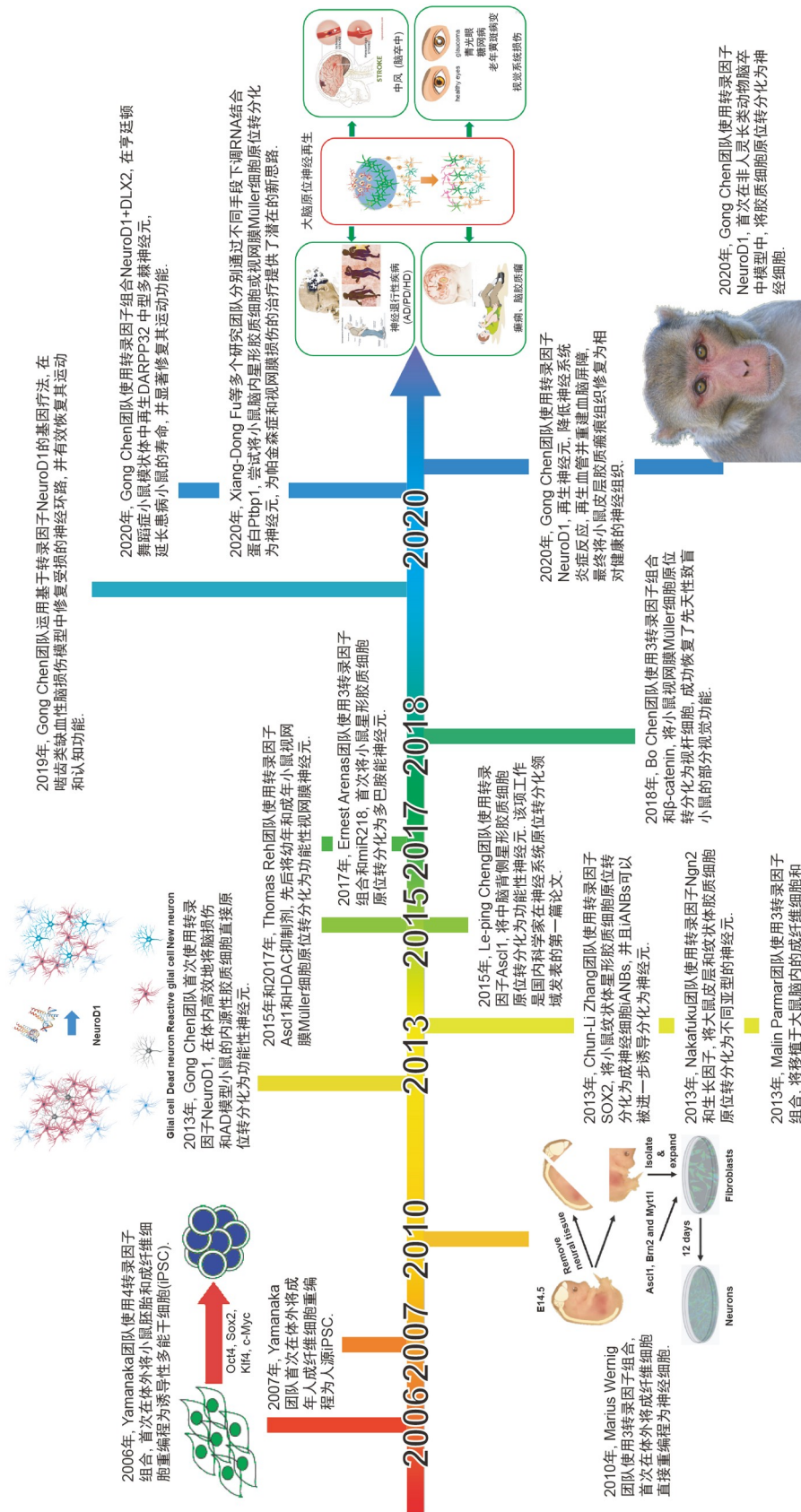


图1 大脑原位神经再生技术发展简史。本图列出了大脑原位神经再生技术受诱导多能干细胞和体外重编程技术启发, 陆续出现并发展壮大, 同时逐步应用于神经疾病动物模型以及非人灵长类动物模型的研究进程

Figure 1 A brief history of the development of *in vivo* reprogramming technology. Inspired by induced pluripotent stem cells and *in vitro* reprogramming, *in vivo* reprogramming in the CNS has been achieved in both rodents and non-human primates. It has emerged as a promising technology to treat CNS injuries and diseases

NeuroD1表达在胶质细胞中,特别是星形胶质细胞中后,NeuroD1在几周内就能够把胶质细胞转化为神经元.除了NeuroD1之外,其他团队也通过表达各种转录因子,如Ngn2, Sox2, Ascl1或者多因子组合将胶质细胞转化成了神经元^[11,12,17,19,20,24].目前,利用内源性胶质细胞进行原位神经转分化的工作正在加速发展,并显示出巨大的潜在应用价值.

在发现了NeuroD1能够高效地把小鼠大脑的内源性胶质细胞原位转化为功能性神经元之后,本团队开始把这项大脑原位神经再生技术应用到各种重大脑疾病的动物模型上,探索这项新技术是否能够对大脑疾病的治疗开辟一条新途径.脑卒中是本团队首选的重大脑疾病之一.因为缺血性脑卒中发病率很高,所以本团队首先在小鼠上建立了缺血性脑卒中模型.通过逆转录病毒将NeuroD1表达在缺血性损伤区的分裂型胶质细胞中,本团队^[30]发现,胶质细胞可以成功地转化为神经元.随后,为了更好地向临床应用转化,本团队^[30]又使用了在临床治疗方面比较成熟的基因治疗载体AAV来包装NeuroD1并递送到缺血损伤区,发现过表达NeuroD1的星形胶质细胞能够逐渐转化为功能性神经元.这些转化而来的神经元不仅可以发放重复性动作电位,而且能够和其他神经元建立功能性的突触连接,表明这些新生神经元已经整合到了神经环路中.通过在不同时间点的取样观察,还发现这些转化而来的神经元的轴突能够随着时间的推移而逐渐投射到其他脑区,包括大脑半球之间的对侧投射和同侧脑区的投射.行为学实验还发现,在接受了NeuroD1介导的基因治疗之后,脑卒中模型动物的运动和认知功能也有显著的改善^[30].然而,本团队清醒地意识到前人已经有一千多种旨在治疗脑卒中的神经保护药物在动物实验中被证明有效,却都在临床试验阶段以失败告终^[42],其中一个重要原因可能是这些研究中所用的大小鼠模型动物和人类大脑差异太大,导致临床前小动物实验结果无法在患者的临床试验上重复.因此,大动物模型,特别是非人灵长类动物模型上的实验是中枢神经药物研发进入临床试验前的重要一步.最近,本团队^[31]率先在灵长类猕猴大脑的缺血性脑卒中模型上,将AAV包装的NeuroD1载体表达达到损伤区域的应激性星形胶质细胞中,并将其成功地转化成了神经元.重要的是,当把应激性星形胶质细胞转化为神经元之后,不仅损伤区域的神经元密度显著增加,而且

小胶质细胞介导的免疫炎症反应也随之降低,从而减少了因继发性炎症反应引起的次级损伤,并且取得了一定程度的神经组织修复^[31],这与小鼠模型上观察到的结果一致^[30].另外,本团队^[31]还在猕猴脑卒中模型上试验了不同的治疗时间窗,发现NeuroD1介导的基因疗法在卒中后的10~30天都能够有效地再生新神经元,从而有可能为脑卒中患者提供一个较为宽广的治疗时间窗.令人欣喜的是,本团队运用NeuroD1基因疗法治疗脑卒中的工作也已经得到了其他实验室的部分验证^[43,44].虽然更多的工作,特别是灵长类动物上的临床前研究还需要进一步深入开展,但已有的猕猴大脑内原位神经再生的成功预示着这种神经再生型基因疗法有可能给脑卒中病人带来新的希望.

2 阿尔茨海默症

痴呆症是一种记忆及认知能力发生进行性衰退的中枢神经系统退行性疾病,其中阿尔茨海默症是最为常见的一种痴呆症,约占总病例的70%.AD患者的发病年龄大多在65岁以后,只有不到5%的患者发病年龄在65岁之前,属于早发型AD^[45].AD发病过程隐秘,早期以记忆下降为主,逐渐丧失日常生活自理能力,并伴有行为和精神障碍.目前发病原因不明,临床诊断困难,尚无有效的治疗手段.2019年,国际阿尔茨海默症协会估计全球AD患者超过5000万,到2050年,这一数字将达到1.52亿.随着我国人口老龄化日趋严重,阿尔茨海默症患病率也逐年升高,这将给我国的社会和家庭带来沉重的经济和精神负担.

AD自1906年由德国医生Alois Alzheimer首次进行了系统性的病理描述后,至今其发病机制仍不清楚.目前,细胞外的 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)异常累积和神经细胞内Tau蛋白过度磷酸化引发的神经原纤维缠结所导致的神经毒性作用,是AD发病机制假说中比较公认的两大学术流派^[46,47].因此,如何减少脑内A β 和Tau蛋白过度磷酸化便成为研究AD最为热门的领域.比如,针对A β 的单克隆抗体药物aducanumab,早期的临床试验发现其能够显著地减少患者脑内A β 的堆积^[48],但是近期的III期临床试验结果显示,AD患者的认知功能并未因此而得到显著改善^[49,50].于是,很多研究者的目光又投向了Tau蛋白,认为Tau蛋白的过度磷酸化才是AD的驱动者^[51,52],但

是就在最近, 针对Tau蛋白的III期临床试验同样折戟沉沙^[53]. AD是一类渐进性的神经退行性疾病, 如何保护神经元, 改善微环境也是治疗AD策略之一, 因此目前也有很多药物开发是针对神经保护和抗炎作用, 比如我国近期上市的治疗AD新药GV-971^[54], 但其真实的临床效果还有待进一步的观察^[55]. 此外, 通过物理手段, 如特定频率(40 Hz)的光和声音刺激, 增加AD模型小鼠大脑的 γ 波活动, 也取得了改善认知功能的效果^[56,57], 相关的临床试验也在积极开展.

AD作为最为常见的神经退行性疾病, 当患者出现明显的临床症状时, 常常伴随着脑萎缩. 来自AD病患大脑的尸检结果显示, AD患者大脑存在广泛的神经元丢失, 特别是与学习记忆和高级认知功能相关的脑区, 如海马和大脑皮层尤为明显^[58]. 考虑到人类大脑有860亿的神经元, AD患者通常会有上亿的神经元丢失, 那么如果不能在AD患者的大脑内再生出新的神经元来替代那些失去的神经元, 就不难理解为什么仅仅减少A β 和Tau蛋白的沉积难以恢复AD患者的学习记忆功能^[59,60]. 2013年底, 本团队^[16]在线发表了运用单个转录因子NeuroD1将AD模型小鼠皮层中的应激性星形胶质细胞原位分化为具有功能性的神经元, 并整合到既有的神经网络中. 重要的是, 本团队在14个月的老年AD小鼠模型上成功地实现了胶质细胞向神经元的转分化, 为阿尔茨海默症的研究和治疗开启了一个新的方向. 同时, 本团队也清醒地认识到该项AD小鼠模型上的研究距离临床应用还有很长的路要走. 除了大脑皮层外, AD病患大脑内神经元丢失比较广泛, 无论是干细胞移植技术还是大脑原位神经再生技术都面临着如何在全脑的不同区域内产生足够数量的新生神经元, 从而达到修复神经环路的目的. 除了神经元变性丢失外, AD大脑内的血脑屏障^[61]、神经干细胞^[62-64]、星形胶质细胞^[65-67]、小胶质细胞^[68,69]和少突胶质细胞^[70]等也都存在着不同程度的病理性改变, 从而影响大脑功能. 因此, 在神经再生的同时, 结合其他治疗技术手段, 降低病患大脑内异常蛋白的沉积并减少神经免疫炎症反应, 改善大脑微环境, 有可能取得更好的疗效.

3 亨廷顿舞蹈症

亨廷顿舞蹈症是一种罕见的常染色体显性遗传性

疾病, 会导致中枢神经元进行性的退变, 从而引起患者的运动和认知功能障碍, 全球约有20万患者. 中国的患者人数尚不明确, 大约有1万~3万人. HD致病原因是位于四号染色体上编码亨廷顿蛋白基因中的CAG三核苷酸的重复序列过多(poly Q>36), 导致突变型HTT蛋白(mHTT)在细胞内过量累积, 诱发神经毒性作用^[71]. 因此, 将含有过多CAG重复序列的突变Htt基因, 敲入模式动物基因组中, 如小鼠^[72]、猪^[73]和猴^[74]中, 都能很好地模拟亨廷顿舞蹈症. 人类大脑纹状体中, 95%的神经元为GABA能的中型多棘神经元(medium spiny neurons, MSNs), 其对mHTT蓄积引起的细胞毒性最为敏感, 因而大量丢失, 从而引起患者大脑纹状体严重萎缩和功能性缺失^[75], 目前该疾病尚缺乏有效的治疗手段.

当前临床上对于确诊的HD患者主要采用药物干预疗法(如四苯喹啉, Tetrabenazine), 但其干预治疗窗口短, 且只能缓解舞蹈样症状, 患者最终仍面临无药可医的局面^[76]. 由于HD属于单基因突变类疾病, 近年来随着基因治疗技术的发展, 涌现了大量针对mHTT的基因治疗手段, 如靶向的反义寡聚核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)、RNA干扰(包括siRNA(small interfering RNA)、shRNA(short hairpin RNA)以及miRNA(microRNA))和CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)基因编辑等技术^[77]. 其中, ASO药物(Tominersen, WVE-120101, WVE-120102)以及RNA干扰类药物(AMT-130)已经进入临床试验阶段^[78]. 此外, 近期由我国科学家鲁伯垠团队^[79]开发的“分子胶水”, 可以特异性地将病变蛋白与自噬小体相连, 起到降解有毒蛋白的作用, 在模型动物上取得了良好的效果. 但是, 上述疗法对于早期HD效果可能较为理想, 而对于已经出现了大量神经元丢失的中晚期HD患者来说, 如何再生新神经元和重构神经环路仍是一个亟待解决的问题. 随着iPSCs和细胞重编程技术的进展, 不同的研究团队开发了体外诱导分化技术, 成功地分化出功能性MSNs, 并且移植入HD模型小鼠的大脑纹状体中, 试图改善模型动物的运动障碍^[80-82], 但迄今为止尚未有成功的临床试验^[83].

近年来开发的大脑原位神经再生技术为HD的治疗带来了新的曙光. 利用大脑内源性的胶质细胞为前体细胞, 通过表达不同的神经转录因子, 已有系列报

道成功地将小鼠纹状体中的星形胶质细胞^[25,29,35]和NG2细胞^[22,23]转变为功能性的神经元. 本团队^[29]在HD模型小鼠上的研究发现, 过表达NeuroD1和Dlx2两种转录因子可诱导纹状体中的星形胶质细胞直接分化为功能性MSNs. 这些胶质细胞转分化而来的神经元不仅具有电生理功能, 而且它们的轴突可以投射到远处的靶标区域(苍白球和黑质网状部)从而整合到大脑神经环路中^[29]. 更重要的是, 大脑内原位再生的MSNs可部分挽救HD模型小鼠纹状体的萎缩, 改善HD模型小鼠的运动功能, 并显著地延长其寿命^[29]. 当然, 由于致病基因的突变并未得到纠正, HD模型小鼠脑内的毒性蛋白仍然聚集, 如果把该项神经再生技术与其他基因沉默或基因编辑等技术结合起来, 有可能进一步降低毒性蛋白的聚集, 取得更加理想的治疗结果. 另外, 由于小鼠和人类大脑差异巨大, 在大动物模型上特别是灵长类动物的HD模型上实现大脑原位神经再生将会为临床应用铺平道路.

4 帕金森病

帕金森病是继阿尔茨海默症后第二常见的神经退行性疾病. PD的患病率随着年龄的增长而增加, 在80岁以上的人群中患病率为1.7%^[84], 预计2030年我国的PD患者将达到500万人^[85]. PD有四种主要的运动症状: 颤抖、肢体僵硬、动作迟缓和姿态不稳, 主要是由于黑质致密部(substantia nigra pars compacta, SNc)多巴胺能神经元的渐进性缺失导致纹状体多巴胺(dopamine, DA)分泌不足引起的. 现有的药物治疗方法主要集中于向大脑补充DA, 或使用激动剂刺激DA受体. 深部脑刺激是最常用的手术治疗PD的方法^[86]. 此外, 干预炎症反应和改善脑膜淋巴引流也可能是值得探索的新型治疗策略^[87,88]. 值得注意的是, 无论是药物治疗还是手术治疗都不能减缓或停止PD患者DA神经元退行性病变的进程. 因此, 治疗PD还需要探索更加有效的方法来阻止DA神经元的丢失, 并且能够再生出足够数量的新DA神经元来重建黑质-纹状体的通路. 胚胎细胞移植^[89]是最早使用的细胞治疗PD的策略. 移植人类胎儿腹侧中脑组织可以改善部分PD患者的症状^[90], 然而有些患者(15%~56%)也出现了不受控制的运动^[91]. 运用ESC或hiPSC(human iPSC)来源的中脑DA神经元前体细胞, 或体细胞直接转分化而来的DA神经元, 移

植到PD模型动物的脑内有助于其部分行为的恢复^[92-98]. 最近有报道在一个自发性PD患者脑中植入患者自体hiPSC来源的中脑多巴胺能前体细胞, 部分改善了PD症状^[99]. 但生产个性化的hiPSC需要很高的成本, 是否能够广泛地应用于大量的PD患者尚未可知^[100].

基因疗法是治疗PD的另一种很有前景的治疗途径. 比如, 利用多顺反子慢病毒载体来运载从酪氨酸合成DA所需的3个合成酶的基因, 包括酪氨酸羟化酶、GTP环水解酶 I 和AADC^[101], 在改善PD的病症方面已经取得了初步成功. 此外, 一些神经营养因子(neurturin, GDNF, BDNF, CDFN)在临床前模型中显示出令人鼓舞的结果^[102,103], 然而neurturin的临床试验却没有达到预期的终点^[104]. 考虑到神经营养因子有可能保护神经元从而延缓PD的进程, 或许临床试验仍然值得进行. 另一种基因疗法则是利用大脑内源性胶质细胞原位直接分化为DA神经元. Arenas研究组^[25]首先报道了运用神经转录因子组合NeuroD1, Ascl1, Lmx1a以及miR218将PD模型小鼠纹状体的星形胶质细胞转化为DA神经元. 杨辉团队^[35]也报道了在PD模型小鼠纹状体的星形胶质细胞中通过基因编辑将*PTBP1*基因敲低可以产生DA神经元. 但是由于纹状体内95%的神经元都是GABA能神经元, 为何纹状体的胶质细胞会转化为DA神经元尚存争议, 且这种纹状体内“异位再生”的DA神经元对纹状体的局部神经环路乃至更广泛的大脑神经环路是否产生不良影响还有待进一步研究. 事实上, 付向东团队^[34]在另一项类似的研究中发现, 在小鼠的纹状体星形胶质细胞中敲降*PTBP1*并不能再生出DA神经元, 只有在小鼠SNc的星形胶质细胞里把*PTBP1*敲低后才能转分化出功能性DA神经元, 并缓解PD小鼠的运动症状. 值得注意的是, 当PD小鼠的年龄从两个月大的幼鼠扩展到一岁大的成年鼠时(一岁大的鼠与PD患者的发病年龄相当), 敲降*PTBP1*的治疗效果显著降低^[34], 提示未来的临床前研究需要在老年的PD动物模型上实现神经再生和功能改善才有可能应用到临床上.

5 视网膜疾病

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)、青光眼(glaucoma)以及老年黄斑变性(aged-related ma-

cular degeneration, AMD)是目前主要的神经性致盲眼病, 其高患病率和高致盲率给患者家庭以及社会带来了沉重的负担。随着糖尿病患者的年轻化, DR超过青光眼跃居成为全球首要致盲眼病, 全球每年失明人群中, 约有5%是由DR所致, 在我国DR的患者人数约为2900万, 约占糖尿病患者的21%^[105,106]。青光眼是全球第二大致盲眼病, 全世界大约有6680万患者, 并且患者数目急速增长, 预计到2040年全球青光眼患病人数将超过1.1亿, 约有60%的青光眼患者分布在亚洲^[107,108]。此外, 由于生存年龄延长和人口老龄化, 我国AMD患病率也在逐年增加, 65岁以上人群的发病率约为17%^[109]。目前临床针对神经性致盲眼病的主要治疗手段仍然为药物治疗、激光治疗以及手术治疗, 虽然能在一定程度上滋养视网膜并减缓病程, 但却无法阻止或者逆转疾病的发展。

成年哺乳动物的视网膜中缺乏内源性干细胞, 受到疾病损伤时, 神经元难以再生, 受损区域神经元不断减少, 最终对视网膜的结构和视觉功能造成不可逆的损伤^[28]。要想从根本上治疗神经性致盲疾病, 需要重新再生新神经元来弥补丢失的神经元。目前, 运用细胞移植的方法再生神经元或人工视网膜移植已经进入了临床试验阶段并取得了一定的效果^[110-112], 但外源性移植也面临着诸多难题和障碍。

有趣的是, 硬骨鱼视网膜遭受损伤后, 视网膜主要的胶质细胞之一Müller细胞(Müller glia, MG)会被激活并表现出干细胞特性, 然后自发分化成为视网膜中主要的神经元, 从而修复损伤并恢复视力^[113,114]。在成年大鼠视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)模型中, 科学家也发现, MG在发生增殖的同时伴随着视紫红质的表达增高, 提示MG具有再生成为光感受器细胞的潜力^[115-117]。随着细胞重编程技术的发展, 科学家们通过调节MG细胞里的一系列信号通路, 如Sonic hedgehog(shh), wingless/integrated(Wnt)等来诱导MG增殖并再生视网膜神经元, 但收效甚微^[28,118-120]。2017年, Reh团队^[26]在NMDA引起的视网膜神经节细胞(retina ganglion cell, RGC)损伤小鼠模型中过表达转录因子Ascl1, 成功地将MG转化为具有功能的双极细胞以及少量的无长突细胞, 实现了成年哺乳动物视网膜MG原位转化再生神经元的突破。该研究中, MG转化产生的双极细胞与周围神经元能够形成突触连接, 并且具有ON型视锥双极细胞的光反应性^[26]。随后, 陈波

团队^[27]在转基因小鼠视网膜的MG中过表达转录因子Crx, Otx2和Nrl, 于4周后在视网膜中观察到由MG转化而来的视杆细胞, 并在一定程度上使光感受器细胞功能退化的小鼠恢复感光能力。然而, 该研究中再生出来的细胞类型仅为视杆细胞, 密度也很低, 无法满足蜕变后亟需补充大量光感受器细胞的需求, 失明小鼠也不能辨认颜色和形状。为了解决视锥细胞再生的问题, 张康团队^[121]利用腺相关病毒特异性敲低rd10小鼠视网膜MG中PTBP1的表达, 发现MG胞体能够由内核层向外核层迁移, 并表达视锥细胞的特异性标志物mCAR, 同时ERG结果也显示视锥参与的光反应显著恢复。与此相悖的是, 同样是敲低MG中PTBP1的表达, 杨辉团队^[35]报道了MG转化成为RGC的发现, 并且转化产生的RGC的轴突能够迅速地投射至外侧膝状体核(lateral geniculate nucleus, LGN)和上丘(superior colliculus, SC), 修复NMDA损伤模型动物的视觉功能。这样矛盾的结果亟需同行实验验证加以澄清。另外, 向孟清团队发现, 在MG中过表达转录因子Brn3b和Math5, 也能够诱导MG转化成为RGC, 并在视神经钳夹模型中再生视神经节细胞, 并且投射至LGN和SC, 最终修复视觉功能^[122]。这些研究表明, 利用视网膜里内源性MG细胞进行原位神经再生, 有可能为治疗各种神经性致盲眼病开辟一条全新的途径。当然, MG作为视网膜里的支柱性细胞, 横跨视网膜多层结构, 并且与许多细胞相连接, 如果把大量MG细胞转化为神经元, 对周围细胞以及视网膜结构和功能是否会产生一定的副作用, 还有待深入探讨。

6 脊髓损伤

脊髓是中枢神经系统的重要组成部分, 是大脑与外周信息交流的枢纽。脊髓损伤(spinal cord injury)主要源于车祸、运动意外与暴力冲突等造成的对脊髓的挤压伤, 全球患者大概接近3000万, 中国患者大概有85万^[123,124]。脊髓损伤不仅造成连接大脑与外周的神经传导束的断裂, 严重影响大脑与外周的信息交流, 还会导致脊髓中大量神经元和胶质细胞的死亡^[125]。通常在原发性损伤发生后, 还会伴有因炎症反应、局部缺血、神经兴奋毒性等引起的继发性损伤, 进一步扩大死亡细胞数量和损伤范围, 形成组织空腔^[126]。此外, 损伤后胶质细胞大量增殖, 形成胶质瘢痕阻碍轴突再生以

及建立新的突触联接^[125]. 这些病理变化会导致患者运动和感觉功能的丧失以及交感神经系统异常^[124].

目前临床上脊髓损伤尚无有效的治疗手段, 康复治疗有助于恢复患者部分功能, 但是效果十分有限. 脊髓损伤的研究主要包括: (i) 控制继发性损伤: 包括使用抗炎抗凋亡、降低氧化损伤以及缺血的药物等^[126]; (ii) 促进轴突再生: 包括解除胶质细胞的抑制效应, 消除胶质瘢痕, 运用生物材料填补组织空腔, 使用神经营养因子或基因疗法促进轴突再生^[126]; (iii) 促进未损伤组织的可塑性: 诱导未受损轴突长出轴突侧枝支配下游细胞, 形成新的代偿环路^[127]; (iv) 建立大脑-机器-脊髓人工界面跨越损伤区段^[128,129]; (v) 细胞治疗: 动员内源神经干细胞, 或者移植外源神经干细胞等来替代死亡的神经细胞, 试图恢复神经系统功能^[129~132]. 目前细胞治疗偏向于中继站(relay station)理论, 即内源动员的细胞或者外源移植的细胞作为中继站和上游的神经元以及下游的神经元重新建立神经通路^[133], 但该方法难以再生出脊髓里类型繁多的神经元^[134,135], 且外源细胞移植也存在成瘤风险^[136]. 因此, 这两种细胞治疗的策略在进行临床转化前都尚有各自瓶颈问题需要解决.

近年来逐渐兴起的利用内源性胶质细胞直接再生神经元的方法可能为治疗脊髓损伤提供新的治疗思路. 胶质细胞在脊髓损伤后会增殖形成胶质瘢痕, 已经有两个独立团队利用这些胶质瘢痕再生出了神经组织^[33,137,138]. 张春立团队^[137,138]采取了两步诱导分化的方法, 先在脊髓损伤模型的星形胶质细胞中过表达 Sox2, 将其逆分化为神经元祖细胞, 然后再通过 VPA, BDNF 等小分子化合物和神经营养因子或者敲低 p53 的表达来促进这些神经祖细胞分化为成熟的神经元. 最近, 张春立团队和徐晓明团队^[139]合作, 通过慢病毒(lentivirus)表达 Sox2 将脊髓中的 NG2 胶质细胞转化成分裂型的干细胞样前体细胞(neuroblast), 然后联合其他分子再将前体细胞分化成神经元, 并且在脊髓损伤模型小鼠上看到了运动行为的改善. 本团队^[33]则是在脊髓损伤的背角星形胶质细胞中过表达 NeuroD1, 将其直接转分化为具有脊髓背角特性的功能性神经元, 它们能与其他神经元形成功能性的突触连接, 表明这些转化而来的新神经元可以整合到脊髓神经环路中. 本团队^[33]还进一步发现, NeuroD1 介导的神经再生型基因疗法有较长的干预窗口期, 无论在损伤的早期(10

天)还是晚期(4个月)均可以把星形胶质细胞直接转化为神经元. 此外, 郭家松团队^[140]还发现, 在小鼠坐骨神经损伤模型里, 过表达 NeuroD1 在脊髓腹角运动神经元里能够促进轴突再生. 这些临床前动物实验结果为利用脊髓内源性胶质细胞原位再生神经元从而治疗脊髓损伤提供了重要的理论基础. 不过, 这项新技术能否再生出脊髓里多种类型的神经元并促进脊髓损伤后的患者恢复运动功能, 还需要更多的研究.

7 脑挫伤

不同于神经退行性疾病的渐进性神经元死亡, 脑挫伤/脑创伤(trumatic brain injury, TBI)常常是由于机械外力作用于大脑而引起的急性损伤. 全球每年有超过 5000 万的脑挫伤患者^[141], 中国每年新增脑挫伤患者大约有 80 万^[142]. 脑挫伤可以划分为原发性损伤和继发性损伤: 原发性损伤是急性脑挫伤引起脑细胞的死亡或损伤, 神经元死亡后不能再生, 而胶质细胞在损伤区域会增殖并形成胶质瘢痕, 影响正常的脑功能; 继发性损伤则是由于原发性损伤引起的胶质细胞应激反应和炎症反应等一系列级联效应, 引发进一步的神经元死亡, 继发性损伤如果治疗不当会发生感染、脑水肿甚至危及生命^[141,143].

目前脑挫伤的治疗策略集中在减轻患者的继发性损伤, 比如通过增加患者的脑供血量, 抑制炎症反应等治疗手段或者结合一些神经保护类的药物进行防治. 对于原发性损伤引起的神经元的缺失目前还没有很好的临床治疗策略. 一些临床前的研究尝试细胞替代疗法, 比如向损伤区域注射间充质干细胞以及胚胎来源的神经干细胞等^[13,144~148]. 为了应对外源细胞移植到体内所面临的挑战, 有报道尝试了在 TBI 模型小鼠中将胶质细胞先重编程为多能干细胞, 然后再分化成神经元来治疗脑挫伤, 但遗憾的是这种多能干细胞不可避免地产生了脑肿瘤^[149]. 为了避免脑肿瘤的发生, 本团队^[16]开发了运用神经转录因子 NeuroD1 将脑挫伤引起的应激性星形胶质细胞原位直接转分化为功能性神经元的方法, 该方法不经过神经干细胞的阶段, 为修复脑挫伤提供了新的治疗策略. 最近, 本团队^[32]进一步的研究证明, NeuroD1 能够在脑挫伤区域再生出大量的功能性神经元, 从而将损伤区域的胶质瘢痕逆转为神经组织. 当部分星形胶质细胞转化成神经元后, 剩

余的星形胶质细胞能够分裂增殖, 将胶质细胞对神经元的比例维持在接近正常的水平。此外, 本团队^[32]还发现, 当把应激性的星形胶质细胞转化为神经元后, 被脑挫伤破坏的血脑屏障也得到了明显的修复。除了NeuroD1外, Götz团队^[150]通过表达神经转录因子Ngn2和Nurr1也能够将针刺损伤小鼠的皮层星形胶质细胞转化成锥体神经元, 同时发现大脑皮层里的不同层的胶质细胞能够定向转化为该层的神经元, 不过本团队也注意到, 他们用的病毒剂量非常大, 高达 $3 \times 10^{14} \sim 5 \times 10^{15}$ gc/mL (0.8~1 μ L), 如此高的AAV滴度常常会引起病毒包装的蛋白在神经元里直接表达(泄漏, leakage), 需要引起高度重视。Götz团队^[151]也发现, 在脑挫伤模型上通过在NG2细胞里过表达神经转录因子Sox2能够将其转化成神经元。这些研究结果提示, 大脑原位神经再生技术有可能从根本上解决脑挫伤引起的神经元丢失的问题, 逆转胶质瘢痕组织为神经组织, 从而彻底改变脑挫伤难以治愈的现状。

8 胶质瘤

胶质瘤是常见的原发性颅内恶性肿瘤, 主要是从星形胶质细胞、少突胶质细胞和室管膜来源的神经前体细胞衍生而来, 按其恶性程度分为WHO I~IV级。全世界每年新增患者大约45万^[152,153], 而中国在新发病例和死亡病例数都是高发的国家。根据中国最新的成年弥漫性胶质瘤的临床操作指南^[154], 目前治疗方案主要是在保护脑功能的前提下最大程度手术切除脑肿瘤, 随后进行放疗^[155]。目前, 胶质母细胞瘤患者治疗后的中位生存期仅为14.6个月, 主要原因包括对放疗的抵抗性和耐药性、血脑屏障对药物的阻碍、肿瘤本身浸润性较强, 以及大脑的相对免疫豁免状态等^[156]。新兴的靶向治疗中, 针对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs)或针对EGFRvIII突变的抗体的靶向治疗, 仅在患者中显示出有限的疗效^[157]。受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTK)-PI3K已在临床试验中用作神经胶质瘤的治疗靶标, 但当前的靶向治疗尚未对生存期有显著延长的效果^[158]。其他一系列的免疫疗法, 包括疫苗接种^[159]、溶瘤病毒、免疫检查点的抑制剂等, 尚未出现令人兴奋的结果^[160]。

近几年新兴的利用转录因子转化胶质瘤细胞的研究为胶质瘤的治疗提供了潜在的新方法。焦建伟团队^[161]通过表达三种转录因子Ascl1, Brn2和Ngn2 (ABN)将培养的胶质瘤细胞转化为神经细胞, 有多种神经元标志物表达和电生理特性。随后, 张春立团队^[162]发现, 共表达NGN2和Sox11(sex-determining region Y-box 11)也可将胶质瘤细胞转化为神经元样细胞, 并提高荷瘤小鼠的存活率。本团队^[163]的研究发现, 表达单个神经转录因子NeuroD1, Ngn2或Ascl1都可以将胶质瘤细胞有效地转分化为神经元样细胞。Ngn2和NeuroD1转化的神经元大多数是谷氨酸能神经元, 而Ascl1则有利于GABA能神经元的转化。这和其他团队报道的运用单个转录因子Ascl1和NeuroD1可以直接将胶质瘤细胞转分化为神经元样细胞基本一致^[164,165]。这些新发现有可能为治疗脑肿瘤带来新希望。

9 前景与展望

中枢神经原位再生技术近年来已经从最初的基础研究逐渐展现出广阔的应用前景。和传统的神经再生技术相比, 利用内源性的胶质细胞进行原位神经再生显然既经济又便捷, 无需建立昂贵的干细胞库, 避免了长期的干细胞冻存和复苏的步骤以及不同细胞批次之间的异质性, 也没有外源细胞移植带来的诸多困扰包括免疫排斥和成瘤风险等^[11~13]。表1总结了运用神经原位再生技术在各种神经疾病动物模型上进行干预的代表性工作。从表1可以看到, 除了星形胶质细胞外, 其他胶质细胞, 如小胶质细胞、少突胶质细胞、NG2细胞和视网膜Müller细胞等亦可以通过表达不同的转录因子再生出不同类型的神经元。神经元转化的亚型和效率主要与三个重要因素相关: (i) 转化因子的选择; (ii) 胶质细胞谱系来源; (iii) 神经再生的脑区或脊髓位置等^[167]。选择何种转化因子应该依据某一特定疾病在哪个脑区的哪种神经元缺失了来有的放矢; 而选择哪种胶质细胞进行转分化也应该依据该脑区的胶质细胞的丰度, 损伤后的增殖速率, 以及在发生谱系上是否与缺失的神经元谱系接近来确定。值得注意的是, 目前基因治疗常用的AAV在中枢神经系统主要感染神经元和星形胶质细胞, 不太感染小胶质细胞和NG2细胞。本团队和其他团队也发现, 损伤后的应激性胶质细胞比静息态的胶质细胞更容易转分化。而针对不同

表 1 原位神经再生技术在多种神经疾病模型中的研究进展

Table 1 The summary of *in situ* neuroregeneration in various disease models

损伤/疾病模型	起始细胞类型	递送系统和作用因子	转分化神经元效率(NeuN ⁺)和亚型	修复/治疗效果	参考文献
大鼠大脑中动脉熔断型缺血模型	皮层/纹状体分裂细胞	逆转录病毒系统表达Ngn2+生长因子(bFGF+EGF)	低(逆转录病毒)	未检测	[19]
小鼠运动皮层ET-1诱导局灶性缺血模型	皮层星形胶质细胞	AAV9系统表达NeuroD1	17天转化效率: >70%; >50% Tbr1 ⁺ 皮层神经元(包含Cux1 ⁺ 浅层和Ctip2 ⁺ 深层皮层神经元); ~10% GABA ⁺ 和PV ⁺ 抑制性神经元	组织学水平显著修复、环路重建、运动功能显著改善	[30]
		AAV5系统表达NeuroD1	27% NeuN ⁺ 神经元, 包含Cux1 ⁺ 浅层和Ctip2 ⁺ 深层皮层神经元	运动行为异常显著改善	[43]
恒河猴初级运动皮层ET-1诱导局灶性缺血模型	皮层星形胶质细胞	AAV9系统表达NeuroD1	42天转化效率: >90%; 包含Tbr1 ⁺ 皮层神经元以及少量PV ⁺ 中间神经元	组织学水平显著修复	[31]
小鼠大脑中动脉暂时性栓塞型缺血模型	皮层和纹状体分裂细胞	逆转录病毒系统表达Ascl1+Sox2+NeuroD1	低(逆转录病毒)	组织学未有显著修复、行为学未有显著改善	[44]
小鼠5xFAD阿尔茨海默病模型	皮层星形胶质细胞	逆转录病毒系统表达NeuroD1	低(逆转录病毒)	未检测	[16]
小鼠6-OHDA损伤模型	纹状体星形胶质细胞	慢病毒系统表达NeuroD1+Ascl1+Lmx1a+miR218	低, 少量TH ⁺ 神经元	部分缓解运动行为异常	[25]
		AAV-PHP.eB系统通过CRISPR-CasRx下调PTBP1	32% TH ⁺ 神经元	显著改善行为学异常	[35]
	黑质致密部星形胶质细胞	AAV2系统下调PTBP1	80% NeuN ⁺ 神经元, 30%~35% TH ⁺ 神经元	组织学水平修复、重建黑质-纹状体通路、行为学显著改善	[34]
小鼠R6/2亨廷顿舞蹈症模型	纹状体星形胶质细胞	AAV5系统表达NeuroD1+Dlx2	80% NeuN ⁺ 神经元, 56.6% DARPP32 ⁺ 神经元	组织水平修复、环路重建、运动行为学异常显著改善、延长实验动物寿命	[29]
小鼠皮层针刺损伤	皮层星形胶质细胞	逆转录病毒系统表达NeuroD1	92.8% NeuN ⁺ 神经元, 绝大多数为Ctip2 ⁺ 深皮层神经元	未检测	[16]
	皮层NG2胶质细胞		42.5% NeuN ⁺ 神经元		
	皮层NG2胶质细胞	逆转录病毒系统表达Sox2+Ascl1	低(逆转录病毒)	未检测	[151]
	皮层分裂细胞	逆转录病毒系统表达Ngn2+Bcl2+小分子化合物(Calcitriol或αT3)	90% NeuN ⁺ 神经元, 80% Ctip2 ⁺ , 20% Foxp2 ⁺ 深层皮层神经元	未检测	[20]
	皮层星形胶质细胞	AAV5系统表达Ngn2+Nurr1或者Ascl1+Nurr1	Ngn2+Nurr1: 80% NeuN ⁺ 神经元, 位于浅层皮层的表达Cux1, 位于深层皮层的表达Ctip2; Ascl1+Nurr1: 70% NeuN ⁺ 神经元	未检测	[150]
	皮层星形胶质细胞	AAV9系统表达NeuroD1	~90%	逆转胶质瘢痕为神经组织、神经元/胶质细胞比例恢复、炎症反应降低、血管修复	[32]
小鼠脊髓损伤	脊髓星形胶质细胞	慢病毒系统表达Sox2+小分子化合物VPA	~5%	未检测	[137]
	脊髓星形胶质细胞	慢病毒系统表达Sox2+BDNF+NOG同时敲低P53表达	损伤周边约5000 NeuN ⁺ 神经元, 80%兴奋性神经元	未检测	[138]
	脊髓背角星形胶质细胞	AAV9系统表达NeuroD1	损伤后10天注射病毒, 表达NeuroD1 42天: 55% NeuN ⁺ 神经元; 损伤后10周注射病毒, 表达NeuroD1 70天: 95% NeuN ⁺ 神经元; 约63%为Tlx3 ⁺ 脊髓背角神经元	未检测	[33]

(表1续1)					
损伤/疾病模型	起始细胞类型	递送系统和作用因子	转分化神经元效率(NeuN ⁺)和亚型	修复/治疗效果	参考文献
	NG2细胞	慢病毒系统表达 Sox2/P75-2	损伤病毒注射周边约4000 NeuN ⁺ 神经元; 抑制性神经元和兴奋性神经元比例相当	胶质疤痕体积和表面积都有降低; 行为学14周后有显著改善	[139]
MNU急性损伤SD大鼠光感受器细胞	Müller细胞	SHH-N	BrdU ⁺ 的细胞中约有22.9%的细胞是Rhodopsin ⁺ 的视杆细胞	未检测	[115]
小鼠Gnat ^{rd17} Gnat ^{cp13} 光感受器细胞功能性突变模型	Müller细胞	AAVShH10系统表达 Otx2+Crx+Nrl	97.4% tdTomato ⁺ 细胞为Rhodopsin ⁺ 视杆细胞	重建环路, 一定程度上恢复感光能力	[27]
小鼠Rd10光感受器细胞退变模型	Müller细胞	AAV8系统通过下调PTBP1	近35%的mCAR ⁺ 视锥细胞	对光反应和视觉功能显著恢复	[121]
NMDA损伤模型	Müller细胞	逆转录病毒; NeuroD; NeuroD+Pax6	18%左右的Rhodopsin细胞; 25%表达HPC-1无长突细胞	未检测	[166]
	Müller细胞	Wnta3	BrdU ⁺ 的细胞中有44.1%的细胞表达Rhodopsin	未检测	[119]
	Müller细胞	FGF1; EGF; FGF1+胰岛素	少量Calretin ⁺ 和GAD67 ⁺ 的无长突细胞	未检测	[120]
	Müller细胞	通过基因改造过表达Ascl1	过表达Ascl1的GFP ⁺ 细胞中近20%转化成为Cabp5 ⁺ 的双极细胞, 极少数(不到5%)转化成为HuC/D ⁺ 的无长突细胞	组织水平修复、重建环路	[26]
	Müller细胞	AAV-PHP.eB系统通过CRISPR-CasRx下调PTBP1	损伤后仅剩4%左右的神经节细胞(Brn3a ⁺ 或rbpms ⁺)恢复至20%左右	组织水平修复, 环路重建, 对光反应及明暗视觉显著改善	[35]
小鼠Brn3b ^{AP/AP} 神经节细胞退变模型; 视神经钳夹模型	Müller细胞	AAVShH10系统表达 Brn3b+Math5	92.8% Rbpms ⁺ 神经节细胞	组织水平修复、环路重建, 视觉功能得到显著恢复	[122]
裸鼠	50万胶质瘤细胞	慢病毒系统表达Ascl1+Brn2+Ngn2; 纹状体移植感染细胞	原代胶质瘤细胞的转分化效率为20%~40%, Tuj1 ⁺ 细胞	抑制细胞增殖, 小鼠肿瘤体积减小, 荷瘤小鼠生产期延长	[161]
NSG小鼠	50万U87胶质瘤细胞	慢病毒系统表达Ngn2+Sox11; 细胞移植在纹状体, 2天后注射病毒	95%细胞转分化为Tuj1 ⁺ , MAP2 ⁺ 细胞; 95%是vGlut1 ⁺ 和vGlut2 ⁺ 的细胞, <2%是GABA ⁺ 或GAD67 ⁺	抑制细胞增殖, 荷瘤小鼠生存期延长	[162]
	50万U251胶质瘤细胞	慢病毒系统表达Ascl1; 纹状体移植感染细胞	中间型神经元不是运动神经元; 细胞转分化为DCX ⁺ , Tubb3 ⁺ 或MAP2 ⁺ ; >50%是vGlut1 ⁺ , <20%是GABA ⁺	退出细胞周期, 抑制细胞增殖, 小鼠肿瘤体积减小, 荷瘤小鼠生存期延长	[164]
CB17/SCID小鼠	来自Pitcl1 ^{+/-} 小鼠Medulloblastoma细胞; 人的Hh MB细胞系(ICb-5610MB)	慢病毒系统表达NeuroD1	细胞转分化为Tuj1 ⁺ 或MAP2 ⁺	荷瘤小鼠生存期延长	[165]
Rag1 ^{-/-} 免疫缺陷小鼠	50万U251胶质瘤细胞	逆转录病毒表达NeuroD1或Ngn2或Ascl1; 病毒和细胞一起注射在纹状体	DCX ⁺ , Tuj1 ⁺ , Prox1 ⁺ 细胞; NeuroD1和Ngn2主要分化为谷氨酸能神经元; Ascl1主要分化为GABA能神经元	抑制细胞增殖, 减少应激性胶质细胞	[163]

的脑损伤或者退行性病变应该选择何种转分化策略, 比如是选用特定的转录因子将胶质细胞定向转化为某一特定类型的神经元, 还是通过敲降胶质细胞中的某些因子并依赖局部微环境的影响来再生神经元, 目前还没有系统性的比较研究, 这应该是该领域未来发展

的一个重要方向.

当然, 如同任何一项新技术都有它的利弊一样, 中枢神经原位再生技术也有它内在的局限性. 当把该技术应用到一系列中枢神经系统疾病的动物模型中进行神经再生时, 本团队发现, 如果胶质细胞和神经元同时

受到严重损伤, 比如在大面积脑卒中和脊髓损伤的情况下, 神经再生的效率明显降低. 因此, 本团队推测大面积的神经元和胶质细胞损伤可能需要辅以其他治疗手段, 包括干细胞和生物材料填充等方法, 通过复合疗法来达到较好的效果. 在新神经元再生后, 也可以结合神经营养因子和运动康复疗法等来加快新生神经元的成熟和突触连接, 尽快帮助新生神经元整合到已有的神经环路中. 从应用转化前景来看, 也还有许多技术问题包括可能遇到的瓶颈需要解决, 比如运用什么样的载体来安全有效地递送转化因子? 在高效再生神经元的同时, 如何避免或者降低免疫反应和其他副作用? 由于人脑体积远远大于啮齿类动物, 病人脑内原位转化而来的新生神经元投射到目标靶区需要很长时间, 因而小动物实验的成功还只是第一步, 需要在大型动物特别是成年灵长类动物模型上得到验证才有可能对临床转化提供有意义的指导意见. 此外, 新一代基因治疗病毒载体或者非病毒载体的开发, 基于单细胞高通量测序的转录组学和表观组学分析, 以及高时空分辨率的脑成像技术等都有望助力该领域取得新的突破.

随着越来越多的实验室加入中枢神经原位再生的研究领域, 有一些问题亟待解决. 首先是所谓的病毒直接泄漏到神经元的问题, 这常常是因为实验者使用了过高的病毒剂量而导致的. 特别值得注意的是, 当使用 AAV Cre 腺相关病毒时更需谨慎, 本团队^[33]通常推荐使用 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ gc/mL 的滴度, 以把假阳性比例降到 5% 或者更低. 在确证了转分化之后, 为了在中枢神经损伤或疾病模型上高效地再生出大量的新神经元从而达到较好的修复效果, 可以适当提高 AAV 病毒的使用浓度, 比如 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ gc/mL. 因此, 病毒滴度的选择一定要看想解决什么样的科学问题: 如果是做基础研究转分化, 就选用低滴度来保证专一性; 如果是要再生大量神经元进行有效的组织修复, 可以适当提高滴度, 统筹兼顾专一性和有效性. 有些实验室使用了过高的 AAV, 比如超过 1×10^{13} gc/mL 的滴度^[35,150,168], 这种高滴度有可能造成的假阳性值得关切^[169,170], 有些实验结果需要第三方使用低滴度病毒重复验证后才能令人信服. 另一个重要问题是如何避免或者减少在某个脑区再生出异位或者异质神经元, 比如在纹状体 GABA 能神经元的环境中再生出 DA 神经元^[25,35], 这些异位 DA 神经元是否会对局部神经环路和更广泛的神经环路带来不良影响? 异位或者异质神

经元是否会投射到不该投射的靶区? 这些问题都需要严格的实验证据加以解答. 当然, 最终临床应用也要权衡再生神经元对患者的利与弊, 从而找到一个平衡点. 第三个问题是有关基因突变引起的神经元退变和死亡. 当把胶质细胞转化为神经元以后, 这些新生神经元可能最终逃脱不了因为其内在的基因突变而导致的死亡. 针对这些疾病, 结合基因编辑来修正突变的基因可能是一条有效的途径. 第四个问题是关于白质神经纤维束相关的疾病. 显然, 再生神经元不一定能够直接治疗因为脱髓鞘而造成的白质相关疾病, 比如多发性粥样硬化症 (multiple sclerosis), 但是本团队^[30]也注意到, 当把胶质细胞转化为神经元后, 损伤区域的髓鞘化也显著增加. 因此, 中枢神经原位再生对于白质损伤是否有一定的修复效果也可能值得研究. 另外, 本团队和 Götz 团队同时报道了胶质细胞转化为神经元的效率在灰质和白质区域有很大的不同: 灰质里的星形胶质细胞转化效率高, 而白质里的星形胶质细胞转化效率低^[105,150], 这一发现对灰质和白质的修复可能很有意义. 最后值得一提的是胶质细胞在不同状态下其转化效率可能也很不一样. 我们发现, 神经损伤或者退行性病变所引起的应激性星形胶质细胞转化效率很高, 而静息态的星形胶质细胞转化效率则比较低, 推测这很可能与它们的表观遗传状态有关. 胶质细胞的状态也和年龄有关. 比如, 敲降 *PTBP1* 在年轻的小鼠上易于将胶质细胞转化为神经元, 但在老年小鼠上的转化效率则显著降低^[34]. 此外, 不同脑区的胶质细胞在不同的疾病模型上也可能有不同的转化效率. 因此, 中枢神经原位再生技术方兴未艾, 仍有许多未知的问题值得深入探讨. 本团队在过去 10 年里在中枢神经原位再生领域有了大量的工作积累, 通过小鼠、大鼠、猕猴的系列性研究, 总结了以下 8 点建议作为辨别真正的胶质细胞原位转分化为神经元的指导性原则.

(1) 转分化因子必须在早期病毒感染的胶质细胞中被清晰地检测到.

(2) 病毒感染的细胞在早期必须呈现典型的胶质细胞形态, 然后逐渐向神经元形态转变, 有一个动态转化过程.

(3) 捕捉胶质细胞转分化时期的中间态, 比如在病毒感染的早期或者中期, 是否有神经元特异性标记物和胶质细胞特异性标记物同时出现或者都不出现的中间态.

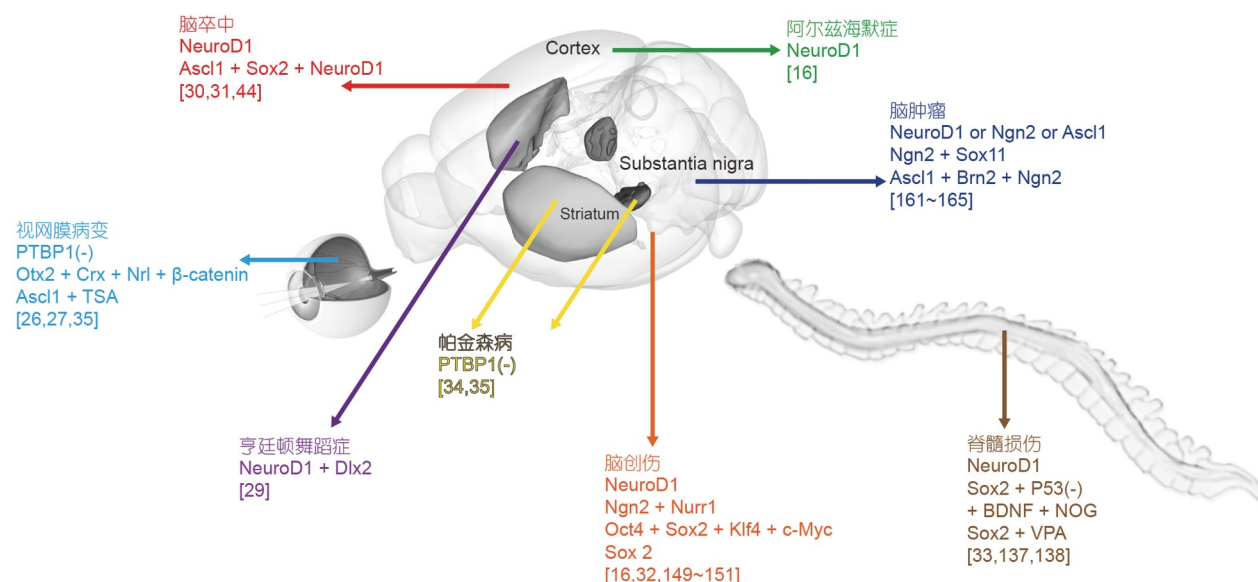


图 2 大脑原位神经再生技术治疗多种中枢神经系统疾病的研究进展。本图汇总了目前为止中枢神经原位再生技术被尝试用于治疗脑卒中、阿尔兹海默症、帕金森病、亨廷顿舞蹈症、视网膜病变、脑肿瘤、脑创伤和脊髓损伤的研究工作进展

Figure 2 A summary of the studies of *in vivo* reprogramming in CNS injuries and diseases. *In vivo* reprogramming has shown potential in treating a variety of CNS injuries and disorders including stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, retinal damage, congenital blindness, brain tumor, traumatic brain injuries and spinal cord injuries

(4) 研究胶质细胞向神经元转分化过程中基因表达谱的变化,特别是运用单细胞测序技术来捕捉中间态细胞的存在。

(5) 电生理记录应显示出胶质细胞电生理特性向神经元电生理特性的时间依赖性转变。

(6) 逆行示踪和顺行示踪应显示出原位转分化而来的新生神经元其轴突投射到目标靶区呈现明显的时间依赖性。

(7) 在体外和体内条件下,至少运用两种不同类型的病毒载体(逆转录病毒、AAV、慢病毒),并且在一系列不同剂量的情况下,确认转分化因子介导的胶质细胞向神经元的转化。

(8) 运用谱系示踪技术事先标记待转化的胶质细胞,确认再生出来的新神经元是从原来标记过的胶质细胞转化而来。

如果能够运用上述这些基本原则进行实验设计,将会大大减少因实验不当而导致的假阳性结果,大大

推动该新兴领域健康发展。

除了过表达神经转录因子和敲降*PTBP1*以外,运用小分子化合物组合将胶质细胞转化为神经元也是一类新方法^[171~176],当然该方法还需要解决一系列的技术难题,包括不同小分子的配比和通透血脑屏障等。从长远看,小分子介导的药物再生疗法可能对于诸如阿尔茨海默症等弥散性神经退行性疾病有较好的治疗作用,而脑内直接注射病毒的基因疗法则可能对于像帕金森综合征和亨廷顿舞蹈症等局部神经元死亡的疾病有精准的治疗效果。

综上所述,中枢神经原位再生技术正在被广泛地应用到各种中枢神经疾病的临床前动物模型的治疗上,并且取得了初步成效(图2)。虽然还有许多问题需要解决,但相信通过和其他现有技术相结合,包括干细胞和生物材料填充、基因编辑、运动康复等,有可能在啮齿类和非人灵长类的疾病模型上实现新的突破,从而根本性地改变中枢神经疾病难以治愈的现状。

参考文献

- 1 Feigin V L, Vos T, Nichols E, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol*, 2020, 19: 255–

265

- 2 Hou Y, Dan X, Babbar M, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15: 565–581
- 3 DiLuca M, Olesen J. The cost of brain diseases: a burden or a challenge? *Neuron*, 2014, 82: 1205–1208
- 4 Gooch C L, Pracht E, Borenstein A R. The burden of neurological disease in the United States: A summary report and call to action. *Ann Neurol*, 2017, 81: 479–484
- 5 Zerna C, Thomalla G, Campbell B C V, et al. Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. *Lancet*, 2018, 392: 1247–1256
- 6 Powers W J, Rabinstein A A, Ackerson T, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients with Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 2018, 49: e46–e110
- 7 Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*, 2018, 7: 1161
- 8 Cummings J L, Tong G, Ballard C. Treatment combinations for Alzheimer's disease: current and future pharmacotherapy options. *J Alzheimers Dis*, 2019, 67: 779–794
- 9 Armstrong M J, Okun M S. Diagnosis and treatment of Parkinson disease. *JAMA*, 2020, 323: 548–560
- 10 Cabreira V, Massano J. Parkinson's disease: clinical review and update. *Acta Med Port*, 2019, 32: 661–670
- 11 Li H, Chen G. *In vivo* reprogramming for CNS repair: regenerating neurons from endogenous glial cells. *Neuron*, 2016, 91: 728–738
- 12 Lei W, Li W, Ge L, et al. Non-engineered and engineered adult neurogenesis in mammalian brains. *Front Neurosci*, 2019, 13: 131
- 13 Goldman S A. Stem and progenitor cell-based therapy of the central nervous system: hopes, hype, and wishful thinking. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 174–188
- 14 Mertens J, Marchetto M C, Bardy C, et al. Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17: 424–437
- 15 Gascón S, Masserdotti G, Russo G L, et al. Direct neuronal reprogramming: achievements, hurdles, and new roads to success. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 18–34
- 16 Guo Z, Zhang L, Wu Z, et al. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 188–202
- 17 Niu W, Zang T, Zou Y, et al. *In vivo* reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 1164–1175
- 18 Torper O, Pfisterer U, Wolf D A, et al. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 7038–7043
- 19 Grande A, Sumiyoshi K, López-Juárez A, et al. Environmental impact on direct neuronal reprogramming *in vivo* in the adult brain. *Nat Commun*, 2013, 4: 2373
- 20 Gascón S, Murenu E, Masserdotti G, et al. Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 396–409
- 21 Niu W, Zang T, Smith D K, et al. SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain. *Stem Cell Rep*, 2015, 4: 780–794
- 22 Pereira M, Birtele M, Shrigley S, et al. Direct reprogramming of resident NG2 glia into neurons with properties of fast-spiking parvalbumin-containing interneurons. *Stem Cell Rep*, 2017, 9: 742–751
- 23 Torper O, Ottosson D R, Pereira M, et al. *In vivo* reprogramming of striatal NG2 glia into functional neurons that integrate into local host circuitry. *Cell Rep*, 2015, 12: 474–481
- 24 Liu Y, Miao Q, Yuan J, et al. Ascl1 converts dorsal midbrain astrocytes into functional neurons *in vivo*. *J Neurosci*, 2015, 35: 9336–9355
- 25 Rivetti di Val Cervo P, Romanov R A, Spigolon G, et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes *in vitro* and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 444–452
- 26 Jorstad N L, Wilken M S, Grimes W N, et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*, 2017, 548: 103–107
- 27 Yao K, Qiu S, Wang Y V, et al. Restoration of vision after *de novo* genesis of rod photoreceptors in mammalian retinas. *Nature*, 2018, 560: 484–488
- 28 Ueki Y, Wilken M S, Cox K E, et al. Transgenic expression of the proneural transcription factor Ascl1 in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13717–13722

- 29 Wu Z, Parry M, Hou X Y, et al. Gene therapy conversion of striatal astrocytes into GABAergic neurons in mouse models of Huntington's disease. *Nat Commun*, 2020, 11: 1105
- 30 Chen Y C, Ma N X, Pei Z F, et al. A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion. *Mol Ther*, 2020, 28: 217–234
- 31 Ge L J, Yang F H, Li W, et al. *In vivo* neuroregeneration to treat ischemic stroke through NeuroD1 AAV-based gene therapy in adult non-human primates. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 590008
- 32 Zhang L, Lei Z, Guo Z, et al. Development of neuroregenerative gene therapy to reverse glial scar tissue back to neuron-enriched tissue. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14
- 33 Puls B, Ding Y, Zhang F, et al. Regeneration of functional neurons after spinal cord injury via *in situ* NeuroD1-mediated astrocyte-to-neuron conversion. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 591883
- 34 Qian H, Kang X, Hu J, et al. Reversing a model of Parkinson's disease with *in situ* converted nigral neurons. *Nature*, 2020, 582: 550–556
- 35 Zhou H, Su J, Hu X, et al. Glia-to-neuron conversion by CRISPR-CasRx alleviates symptoms of neurological disease in mice. *Cell*, 2020, 181: 590–603.e16
- 36 Weinberg M S, Criswell H E, Powell S K, et al. Viral vector reprogramming of adult resident striatal oligodendrocytes into functional neurons. *Mol Ther*, 2017, 25: 928–934
- 37 Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China. *Circulation*, 2017, 135: 759–771
- 38 Markus H, Pereira A, Cloud G. Stroke Medicine. Oxford: Oxford University Press, 2016
- 39 Liu L, Wang D, Wong K S L, et al. Stroke and stroke care in China. *Stroke*, 2011, 42: 3651–3654
- 40 George P M, Steinberg G K. Novel stroke therapeutics: unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments. *Neuron*, 2015, 87: 297–309
- 41 Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—Promise and challenges. *Cell Stem Cell*, 2020, 27: 523–531
- 42 Cai B, Wang N. Large animal stroke models vs. rodent stroke models, pros and cons, and combination? In: Applegate R, Chen G, Feng H, et al., eds. Brain Edema XVI. Acta Neurochirurgica Supplement. Cham: Springer, 2016. 77–81
- 43 Livingston J, Lee T, Daniele E, et al. Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *bioRxiv*, 2020, 929091
- 44 Yamashita T, Shang J, Nakano Y, et al. *In vivo* direct reprogramming of glial lineage to mature neurons after cerebral ischemia. *Sci Rep*, 2019, 9: 10956
- 45 Long J M, Holtzman D M. Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, 2019, 179: 312–339
- 46 Busche M A, Hyman B T. Synergy between amyloid- β and Tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 2020, 23: 1183–1193
- 47 Selkoe D J. Early network dysfunction in Alzheimer's disease. *Science*, 2019, 365: 540–541
- 48 Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 2016, 537: 50–56
- 49 Sabbagh M N, Cummings J. Open peer commentary to “Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE Trials as reported by Biogen December 2019”. *Alzheimers Dement*, 2021, 17: 702–703
- 50 Knopman D S, Jones D T, Greicius M D. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimers Dement*, 2021, 17: 696–701
- 51 Jack Jr C R, Bennett D A, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 2018, 14: 535–562
- 52 Wesseling H, Mair W, Kumar M, et al. Tau PTM Profiles identify patient heterogeneity and stages of Alzheimer's disease. *Cell*, 2020, 183: 1699–1713.e13
- 53 Mullard A. Failure of first anti-tau antibody in Alzheimer disease highlights risks of history repeating. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20: 3–5
- 54 Wang X, Sun G, Feng T, et al. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. *Cell Res*, 2019, 29: 787–803
- 55 Rao Y. Omission of previous publications by an author should be corrected. *Cell Res*, 2020, 30: 819
- 56 Martorell A J, Paulson A L, Suk H J, et al. Multi-sensory gamma stimulation ameliorates Alzheimer's-associated pathology and improves cognition. *Cell*, 2019, 177: 256–271.e22
- 57 Iaccarino H F, Singer A C, Martorell A J, et al. Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature*, 2016,

540: 230–235

- 58 Andrade-Moraes C H, Oliveira-Pinto A V, Castro-Fonseca E, et al. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain*, 2013, 136: 3738–3752
- 59 Vermunt L, Sikkes S A M, van den Hout A, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and *APOE* genotype. *Alzheimers Dement*, 2019, 15: 888–898
- 60 Canter R G, Penney J, Tsai L H. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature*, 2016, 539: 187–196
- 61 Nation D A, Sweeney M D, Montagne A, et al. Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction. *Nat Med*, 2019, 25: 270–276
- 62 Najm R, Rao A, Huang Y. Too much tau in interneurons impairs adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 297–299
- 63 Zheng J, Li H L, Tian N, et al. Interneuron accumulation of phosphorylated tau impairs adult hippocampal neurogenesis by suppressing GABAergic transmission. *Cell Stem Cell*, 2020, 26: 331–345.e6
- 64 Moreno-Jiménez E P, Flor-García M, Terreros-Roncal J, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2019, 25: 554–560
- 65 Wu Z, Guo Z, Gearing M, et al. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun*, 2014, 5: 4159
- 66 Jo S, Yarishkin O, Hwang Y J, et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2014, 20: 886–896
- 67 Habib N, McCabe C, Medina S, et al. Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci*, 2020, 23: 701–706
- 68 Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, et al. Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*, 2018, 173: 1073–1081
- 69 Pluvinage J V, Haney M S, Smith B A H, et al. CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in ageing brains. *Nature*, 2019, 568: 187–192
- 70 Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, et al. Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, 2019, 570: 332–337
- 71 MacDonald M E, Ambrose C M, Duyao M P, et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 1993, 72: 971–983
- 72 Pouladi M A, Morton A J, Hayden M R. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14: 708–721
- 73 Yan S, Tu Z, Liu Z, et al. A Huntington knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in Huntington's disease. *Cell*, 2018, 173: 989–1002.e13
- 74 Yang S H, Cheng P H, Banta H, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 2008, 453: 921–924
- 75 Bates G P, Dorsey R, Gusella J F, et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15005
- 76 Carlozzi N E, Miciura A, Migliore N, et al. Understanding the outcomes measures used in Huntington disease pharmacological trials: a systematic review. *J Huntingtons Dis*, 2014, 3: 233–252
- 77 Yang S, Chang R, Yang H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*, 2017, 127: 2719–2724
- 78 Dash D, Mestre T A. Therapeutic update on Huntington's disease: symptomatic treatments and emerging disease-modifying therapies. *Neurotherapeutics*, 2020, 17: 1645–1659
- 79 Li Z, Wang C, Wang Z, et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds. *Nature*, 2019, 575: 203–209
- 80 Ma L, Hu B, Liu Y, et al. Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 455–464
- 81 Wu M, Zhang D, Bi C, et al. A chemical recipe for generation of clinical-grade striatal neurons from hESCs. *Stem Cell Rep*, 2018, 11: 635–650
- 82 Victor M B, Richner M, Hermansteyn T O, et al. Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron*, 2014, 84: 311–323
- 83 Barker R A, Götz M, Parmar M. New approaches for brain repair—from rescue to reprogramming. *Nature*, 2018, 557: 329–334
- 84 Ma C, Su L, Xie J, et al. The prevalence and incidence of Parkinson's disease in China: a systematic review and meta-analysis. *J Neural Transm*, 2014, 121: 123–134

- 85 Li G, Ma J, Cui S, et al. Parkinson's disease in China: a forty-year growing track of bedside work. [Transl Neurodegener](#), 2019, 8: 22
- 86 Miciocinovic S, Somayajula S, Chitnis S, et al. History, applications, and mechanisms of deep brain stimulation. [JAMA Neurol](#), 2013, 70: 163–171
- 87 Wang Q, Liu Y, Zhou J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. [Transl Neurodegener](#), 2015, 4: 19
- 88 Ding X B, Wang X X, Xia D H, et al. Impaired meningeal lymphatic drainage in patients with idiopathic Parkinson's disease. [Nat Med](#), 2021, 27: 411–418
- 89 Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. [Science](#), 1990, 247: 574–577
- 90 Barker R A, Barrett J, Mason S L, et al. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. [Lancet Neurol](#), 2013, 12: 84–91
- 91 Freed C R, Greene P E, Breeze R E, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. [N Engl J Med](#), 2001, 344: 710–719
- 92 Grealish S, Diguett E, Kirkeby A, et al. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. [Cell Stem Cell](#), 2014, 15: 653–665
- 93 Kriks S, Shim J W, Piao J, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. [Nature](#), 2011, 480: 547–551
- 94 Xiong M, Tao Y, Gao Q, et al. Human stem cell-derived neurons repair circuits and restore neural function. [Cell Stem Cell](#), 2021, 28: 112–126. e6
- 95 Kikuchi T, Morizane A, Doi D, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. [Nature](#), 2017, 548: 592–596
- 96 Caiazzo M, Dell'Anno M T, Dvoretzskova E, et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. [Nature](#), 2011, 476: 224–227
- 97 Liu X, Li F, Stubblefield E A, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells. [Cell Res](#), 2012, 22: 321–332
- 98 Kim J, Su S C, Wang H, et al. Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. [Cell Stem Cell](#), 2011, 9: 413–419
- 99 Schweitzer J S, Song B, Herrington T M, et al. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease. [N Engl J Med](#), 2020, 382: 1926–1932
- 100 Sonntag K C, Song B, Lee N, et al. Pluripotent stem cell-based therapy for Parkinson's disease: Current status and future prospects. [Prog NeuroBiol](#), 2018, 168: 1–20
- 101 Palfi S, Gurruchaga J M, Ralph G S, et al. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. [Lancet](#), 2014, 383: 1138–1146
- 102 Gill S S, Patel N K, Hotton G R, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. [Nat Med](#), 2003, 9: 589–595
- 103 Warren Olanow C, Bartus R T, Baumann T L, et al. Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. [Ann Neurol](#), 2015, 78: 248–257
- 104 Marks Jr W J, Ostrem J L, Verhagen L, et al. Safety and tolerability of intraputamenal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. [Lancet Neurol](#), 2008, 7: 400–408
- 105 Liu M H, Li W, Zheng J J, et al. Differential neuronal reprogramming induced by NeuroD1 from astrocytes in grey matter versus white matter. [Neural Regen Res](#), 2020, 15: 342–351
- 106 Wong T Y, Sabanayagam C. Strategies to tackle the global burden of diabetic retinopathy: from epidemiology to artificial intelligence. [Ophthalmologica](#), 2020, 243: 9–20
- 107 Conlon R, Saheb H, Ahmed I I K. Glaucoma treatment trends: a review. [Can J Ophthalmol](#), 2017, 52: 114–124
- 108 Tham Y C, Li X, Wong T Y, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. [Ophthalmology](#), 2014, 121: 2081–2090
- 109 Fleckenstein M, Mitchell P, Freund K B, et al. The progression of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration.

- [Ophthalmology](#), 2018, 125: 369–390
- 110 MacLaren R E, Pearson R A, MacNeil A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. [Nature](#), 2006, 444: 203–207
 - 111 Nirenberg S, Pandarinath C. Retinal prosthetic strategy with the capacity to restore normal vision. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2012, 109: 15012–15017
 - 112 Hufnagel R B, Ahmed Z M, Corrêa Z M, et al. Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. [Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol](#), 2012, 250: 1117–1128
 - 113 Lindsey A E, Powers M K. Visual behavior of adult goldfish with regenerating retina. [Vis Neurosci](#), 2007, 24: 247–255
 - 114 Sherpa T, Fimbel S M, Mallory D E, et al. Ganglion cell regeneration following whole-retina destruction in zebrafish. [Devel Neurobio](#), 2008, 68: 166–181
 - 115 Wan J, Zheng H, Chen Z L, et al. Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. [Vision Res](#), 2008, 48: 223–234
 - 116 Devoldere J, Peynshaert K, De Smedt S C, et al. Müller cells as a target for retinal therapy. [Drug Discov Today](#), 2019, 24: 1483–1498
 - 117 Goldman D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. [Nat Rev Neurosci](#), 2014, 15: 431–442
 - 118 Wan J, Zheng H, Xiao H L, et al. Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Müller glia in the mammalian retina. [Biochem Biophys Res Commun](#), 2007, 363: 347–354
 - 119 Osakada F, Ooto S, Akagi T, et al. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. [J Neurosci](#), 2007, 27: 4210–4219
 - 120 Karl M O, Hayes S, Nelson B R, et al. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2008, 105: 19508–19513
 - 121 Fu X, Zhu J, Duan Y, et al. Visual function restoration in genetically blind mice via endogenous cellular reprogramming. [bioRxiv](#), 2020, 030981v1
 - 122 Xiao D, Qiu S, Huang X, et al. Directed robust generation of functional retinal ganglion cells from Müller glia. [bioRxiv](#), 2019, 735357v1
 - 123 Yuan S, Shi Z, Cao F, et al. Epidemiological features of spinal cord injury in China: a systematic review. [Front Neurol](#), 2018, 9: 683
 - 124 Lee B B, Cripps R A, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. [Spinal Cord](#), 2014, 52: 110–116
 - 125 Hernández J, Torres-Espín A, Navarro X. Adult stem cell transplants for spinal cord injury repair: current state in preclinical research. [Curr Stem Cell Res Ther](#), 2011, 6: 273–287
 - 126 Hyun J K, Kim H W. Clinical and experimental advances in regeneration of spinal cord injury. [J Tissue Eng](#), 2010, 1: 650857
 - 127 Chen B, Li Y, Yu B, et al. Reactivation of dormant relay pathways in injured spinal cord by KCC2 manipulations. [Cell](#), 2018, 174: 521–535.e13
 - 128 Jackson A, Zimmermann J B. Neural interfaces for the brain and spinal cord—restoring motor function. [Nat Rev Neurol](#), 2012, 8: 690–699
 - 129 Grahn P J, Mallory G W, Berry B M, et al. Restoration of motor function following spinal cord injury via optimal control of intraspinal microstimulation: toward a next generation closed-loop neural prosthesis. [Front Neurosci](#), 2014, 8: 296
 - 130 Tetzlaff W, Okon E B, Karimi-Abdolrezaee S, et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury. [J Neurotrauma](#), 2011, 28: 1611–1682
 - 131 Yang Z, Zhang A, Duan H, et al. NT3-chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2015, 112: 13354–13359
 - 132 Barnabé-Heider F, Frisén J. Stem cells for spinal cord repair. [Cell Stem Cell](#), 2008, 3: 16–24
 - 133 Bonner J F, Steward O. Repair of spinal cord injury with neuronal relays: From fetal grafts to neural stem cells. [Brain Res](#), 2015, 1619: 115–123
 - 134 Lee S K, Pfaff S L. Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. [Nat Neurosci](#), 2001, 4: 1183–1191
 - 135 Caspary T, Anderson K V. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. [Nat Rev Neurosci](#), 2003, 4: 289–297
 - 136 Steward O, Sharp K G, Matsudaira Yee K. Long-distance migration and colonization of transplanted neural stem cells. [Cell](#), 2014, 156: 385–387
 - 137 Su Z, Niu W, Liu M L, et al. *In vivo* conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. [Nat Commun](#), 2014, 5: 3338
 - 138 Wang L L, Su Z, Tai W, et al. The p53 pathway controls SOX2-mediated reprogramming in the adult mouse spinal cord. [Cell Rep](#), 2016, 17: 891–903
 - 139 Tai W, Wu W, Wang L L, et al. *In vivo* reprogramming of NG2 glia enables adult neurogenesis and functional recovery following spinal cord injury. [Cell Stem Cell](#), 2021, 28: 923–937.e4
 - 140 Lai M, Pan M, Ge L, et al. NeuroD1 overexpression in spinal neurons accelerates axonal regeneration after sciatic nerve injury. [Exp Neurol](#),

- 2020, 327: 113215
- 141 Maas A I R, Menon D K, Adelson P D, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. [Lancet Neurol](#), 2017, 16: 987–1048
- 142 Jiang J Y, Gao G Y, Feng J F, et al. Traumatic brain injury in China. [Lancet Neurol](#), 2019, 18: 286–295
- 143 Hiebert J B, Shen Q, Thimmesch A R, et al. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. [Am J Med Sci](#), 2015, 350: 132–138
- 144 Das M, Mayilsamy K, Mohapatra S S, et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of traumatic brain injury: progress and prospects. [Rev Neurosci](#), 2019, 30: 839–855
- 145 Nudi E T, Jacqmain J, Dubbs K, et al. Combining enriched environment, progesterone, and embryonic neural stem cell therapy improves recovery after brain injury. [J Neurotrauma](#), 2015, 32: 1117–1129
- 146 Peruzzaro S T, Gallagher J, Dunkerson J, et al. The impact of enriched environment and transplantation of murine cortical embryonic stem cells on recovery from controlled cortical contusion injury. [Restor Neurol Neurosci](#), 2013, 31: 431–450
- 147 Menge T, Zhao Y, Zhao J, et al. Mesenchymal stem cells regulate blood-brain barrier integrity through TIMP3 release after traumatic brain injury. [Sci Transl Med](#), 2012, 4: 161ra150
- 148 Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. [J Neurosurg](#), 2015, 122: 856–867
- 149 Gao X, Wang X, Xiong W, et al. *In vivo* reprogramming reactive glia into iPSCs to produce new neurons in the cortex following traumatic brain injury. [Sci Rep](#), 2016, 6: 22490
- 150 Mattugini N, Bocchi R, Scheuss V, et al. Inducing different neuronal subtypes from astrocytes in the injured mouse cerebral cortex. [Neuron](#), 2019, 103: 1086–1095.e5
- 151 Heinrich C, Bergami M, Gascón S, et al. Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. [Stem Cell Rep](#), 2014, 3: 1000–1014
- 152 Patel A P, Fisher J L, Nichols E, et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. [Lancet Neurol](#), 2019, 18: 376–393
- 153 Wang X, Chen J X, Zhou Q, et al. Statistical report of central nervous system tumors histologically diagnosed in the Sichuan Province of China from 2008 to 2013: A West China glioma center report. [Ann Surg Oncol](#), 2016, 23: 946–953
- 154 Jiang T, Nam D H, Ram Z, et al. Clinical practice guidelines for the management of adult diffuse gliomas. [Cancer Lett](#), 2021, 499: 60–72
- 155 Liang J, Lv X, Lu C, et al. Prognostic factors of patients with gliomas—an analysis on 335 patients with glioblastoma and other forms of gliomas. [BMC Cancer](#), 2020, 20: 35
- 156 Weller M, Wick W, Aldape K, et al. Glioma. [Nat Rev Dis Primers](#), 2015, 1: 15017
- 157 An Z, Aksoy O, Zheng T, et al. Epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma: signaling pathways and targeted therapies. [Oncogene](#), 2018, 37: 1561–1575
- 158 Pottier C, Fresnais M, Gilon M, et al. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: breakthrough and challenges of targeted therapy. [Cancers](#), 2020, 12: 731
- 159 Weller M, Butowski N, Tran D D, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. [Lancet Oncol](#), 2017, 18: 1373–1385
- 160 Uhm J H, Porter A B. Treatment of glioma in the 21st century: an exciting decade of postsurgical treatment advances in the molecular era. [Mayo Clin Proc](#), 2017, 92: 995–1004
- 161 Zhao J, He H, Zhou K, et al. Neuronal transcription factors induce conversion of human glioma cells to neurons and inhibit tumorigenesis. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e41506
- 162 Su Z, Zang T, Liu M L, et al. Reprogramming the fate of human glioma cells to impede brain tumor development. [Cell Death Dis](#), 2014, 5: e1463
- 163 Wang X, Pei Z, Hossain A, et al. Transcription factor-based gene therapy to treat glioblastoma through direct neuronal conversion. [Cancer Biol Med](#), 2021, doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0499
- 164 Cheng X, Tan Z, Huang X, et al. Inhibition of glioma development by ASCL1-mediated direct neuronal reprogramming. [Cells](#), 2019, 8: 571
- 165 Cheng Y, Liao S, Xu G, et al. NeuroD1 dictates tumor cell differentiation in medulloblastoma. [Cell Rep](#), 2020, 31: 107782
- 166 Ooto S, Akagi T, Kageyama R, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. [Proc Natl Acad Sci](#)

USA, 2004, 101: 13654–13659

- 167 Herrero-Navarro Á, Puche-Aroca L, Moreno-Juan V, et al. Astrocytes and neurons share region-specific transcriptional signatures that confer regional identity to neuronal reprogramming. *Sci Adv*, 2021, 7: eabe8978
- 168 Wang L L, Garcia C S, Zhong X, et al. Rapid and efficient *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion with regional identity and connectivity? *bioRxiv*, 2020, 253195
- 169 Xiang Z, Xu L, Liu M, et al. Lineage tracing of direct astrocyte-to-neuron conversion in the mouse cortex. *Neural Regen Res*, 2021, 16: 750–756
- 170 Qian C, Dong B, Wang X Y, et al. *In vivo* glial trans-differentiation for neuronal replacement and functional recovery in central nervous system. *FEBS J*, 2021, doi: 10.1111/febs.15681
- 171 Zhang L, Yin J C, Yeh H, et al. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 735–747
- 172 Gao L, Guan W, Wang M, et al. Direct generation of human neuronal cells from adult astrocytes by small molecules. *Stem Cell Rep*, 2017, 8: 538–547
- 173 Li X, Liu D, Ma Y, et al. Direct reprogramming of fibroblasts via a chemically induced XEN-like state. *Cell Stem Cell*, 2017, 21: 264–273.e7
- 174 Yin J C, Zhang L, Ma N X, et al. Chemical conversion of human fetal astrocytes into neurons through modulation of multiple signaling pathways. *Stem Cell Rep*, 2019, 12: 488–501
- 175 Ma N X, Yin J C, Chen G. Transcriptome analysis of small molecule-mediated astrocyte-to-neuron reprogramming. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 82
- 176 Zhang M, Lin Y H, Sun Y J, et al. Pharmacological reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by signaling-directed transcriptional activation. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 653–667

***In situ* neuroregeneration: frontiers and therapeutic prospects**

WANG QingSong¹, LI Wen¹, LEI WenLiang¹, CHEN WeiYi¹, ZHENG JiaJun¹, XIANG ZongQin²,
LIU MinHui¹, HE Qing¹, XU Liang¹, LI ZhiFei², WANG Tao¹, WU Zheng¹ & CHEN Gong¹

¹ Guangdong-Hongkong-Macau Institute of CNS Regeneration, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

² Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Neuroregeneration in the adult mammalian central nervous system (CNS) is a long unresolved problem over the past centuries. Previous stem cell research has shown some promise in neural regeneration, but also encountered many challenges. *In situ* neuroregeneration technology is a newly emerged technology that takes advantage of widespread endogenous glial cells to regenerate new neurons in injured areas with neuronal loss. By overexpressing neural transcription factors or knocking down certain factors, glial cells can be directly converted into functional neurons *in situ*, avoiding transplantation of external cell. This review article summarizes current progress and potential applications of *in situ* glia-to-neuron conversion technology in the treatment of stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, retinal disease, and spinal cord injury. Although still in its infant stage with certain limitations, we have already demonstrated the feasibility of *in situ* neuroregeneration in a non-human primate model, paving a potential way toward future clinical trials.

central nervous system, neuroregeneration, stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, retinal disease, spinal cord injury, glioma

doi: 10.1360/SSV-2021-0024