

How can a skin cell become a nerve cell?

皮肤细胞如何成为神经细胞?

裴端卿

中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530

E-mail: pei_duanqing@gibh.ac.cn

2017-05-16 收稿, 2017-06-21 修回, 2017-06-22 接受, 2017-09-14 网络版发表

摘要 如何把皮肤细胞变成神经细胞? 这是2005年*Science* 125周年庆时提出的125个科学前沿问题中的一个重大问题. 本文主要论述了已有的一些成纤维细胞向神经细胞转分化的研究, 包括神经元以及其他神经细胞的诱导, 各种诱导方法以及诱导策略. 目前皮肤细胞成为神经细胞在实验室中已成为现实, 但要走向临床还有很长的路.

关键词 成纤维细胞, 诱导神经元, 诱导神经干细胞

如何把皮肤细胞变成神经细胞? 这是2005年*Science* 125周年庆时提出的125个科学前沿问题中的一个重大问题. 在对这个问题的描述中, 作者把细胞的转分化比作中世纪炼金术士的点金术, 并且在文章结束时说: “搞清楚大约25000个人类基因是如何共同工作形成组织, 以及如何正确地引导未成熟细胞的培养, 将会花费研究者们数十年的时间, 但一旦成功, 这个成果将比黄金珍贵得多^[1]”.

神经系统包括中枢神经系统、周围神经系统和植物神经系统, 许多因素如感染、中毒、免疫损伤、营养障碍、内分泌紊乱以及遗传因素等都可使神经系统受损, 神经细胞的变性、凋亡或者坏死, 会导致神经功能障碍或者缺失. 由于神经细胞的不可再生性, 神经损伤的修复是一个世界性难题, 特别是中枢神经系统, 曾经很长一段时期被认为是无法修复的. 神经元广泛丢失或者脱髓鞘以后, 神经系统很难自我修复, 临床上一直缺乏有效的治疗手段. 利用干细胞(胚胎干细胞和成体干细胞)研究神经的修复一直是干细胞研究的热点. 其中包括胚胎干细胞或成体干细胞的定向诱导、诱导多能性干细胞的定向诱导以及成体细胞的细胞谱系转换获得神经细胞等多种方法. 其中, 成体细胞的细胞谱系转换即将皮肤细胞转换

成神经细胞相对来说, 诱导效率更高, 分化更完全, 有效地降低了成瘤性, 是一种更高效和更安全的诱导方法.

1 神经元的诱导

2010年, 斯坦福大学的Wernig研究组^[2], 用类似Yamanaka的诱导多能性干细胞的技术, 用*Ascl1*, *Brn2/4*和*Myt1L*(ABM) 3个转录因子成功地把小鼠(*Mus musculus*)的成纤维细胞转化成为了诱导神经元(induced neurons, iNs). 这是在这个领域的一次开创性成果, 以后的许多研究都是追随着这个研究. Wernig研究组用的是直接转分化的方法, 这种方法绕过了多潜能细胞或前体细胞, 将一种类型的成体细胞直接跨谱系转化成了另一种成体细胞. 这种方法缩短了诱导时间, 操作比较简单, 致瘤性和免疫原性也比较小. 用这种方法可以成功地诱导多种神经元细胞.

帕金森病是严重危害老年人的一种退行性神经疾病, 多巴胺能神经元是帕金森病的关键细胞, 在帕金森病人的中脑黑质中多巴胺能神经元变性坏死, 使得纹状多巴胺能神经元细胞显著减少, 如果能修复或者再生可以持续分泌多巴胺的神经元就能治疗这个疾病. 2011年, Ding研究组^[3]用*miR-124*和两个转

引用格式: 裴端卿. 皮肤细胞如何成为神经细胞? 科学通报, 2017, 62: 3802–3806

Pei D Q. How can a skin cell become a nerve cell (in Chinese)? Chin Sci Bull, 2017, 62: 3802–3806, doi: 10.1360/N972017-00536

录因子 *MYT1L* 和 *BRN2* 成功地用胎儿成纤维细胞诱导出了多巴胺能神经元。2014年, Dell'Anno 和她的同事们^[4] 用 *Ascl1*, *Nurr1* 和 *Lmx1a* 诱导出了有功能的诱导多巴胺能神经元, 并把它们移植到了帕金森病模型大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的体内, 发现这些诱导出来的小鼠可以长期存活, 并且确实改善了这些大鼠的运动功能。

运动神经元受损会引起一些外周性神经疾病, 例如, 折磨着著名理论物理学家霍金的肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等, 修复和再生运动性神经元就是治疗这一类疾病的关键, Son 等人^[5] 用 ABM 加上了一些特异性的运动神经元的因子把人和大鼠的成纤维细胞转化成了诱导运动神经元 (induced motor neurons, iMNs), 这些 iMNs 具有神经电生理特性并能形成突触, 把它们移植到肌萎缩侧索硬化症的模型小鸡 (*Gallus domesticus*) 的脊髓中后, 发现有 80% 存活的 iMNs 从神经根向周围的肌肉组织伸出了突触。

2 神经胶质细胞的诱导

除了神经元细胞, 成纤维细胞还可以转分化成为神经胶质细胞, 如星形胶质细胞、少突胶质细胞和施旺细胞。星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的细胞, 在神经回路的发育和维持中有重要作用, 有一定的再生功能。星形神经胶质细胞受损会引起类似 ALS 这样的神经退行性疾病, 甚至有报道星形胶质细胞与自闭症和精神分裂症有关。少突胶质细胞形成了包绕神经元轴突的“电线”外皮, 功能异常会导致像多发性硬化症这样的脱髓鞘病变。施旺细胞的作用也是包绕髓鞘, 对周围神经的再生意义重大。

2015年, Caiazzo 等人^[6] 在众多转录因子中筛选出了 *NFIA*, *NFIB* 和 *SOX9* 3 个因子, 可以把人和大鼠的成纤维细胞转化成有功能的诱导星形胶质细胞。Wernig 研究组^[7] 则筛选出 *Sox10*, *Olig2* 和 *Zfp536* 3 个因子, 制备出了高效率的诱导少突胶质细胞, 当把它们移植到髓鞘碱性蛋白基因敲除小鼠的胼胝体和小脑后, 它们可以分化成为成熟的少突胶质细胞, 并且还可以形成包裹了轴突的髓鞘。Thoma 等人^[8] 则仅用一种化合物——多激酶抑制剂化合物 B, 就将包皮成纤维细胞诱导成了施旺细胞, 这些施旺细胞可以形成髓鞘, 而且还具有电生理功能。这些研究为治疗周围神经损伤带来了新的希望。

3 其他诱导方法

3.1 小分子诱导

在所有的重编程转分化的策略中, 小分子诱导具有无基因组整合, 操作简单, 剂量易控与可逆性等优点, 受到了广泛的关注。小分子可以通过调控表观遗传修饰, 信号通路与代谢激酶等多种途径来影响细胞命运转变过程, 进而实现重编程效率的提升并替代相关转录因子。第一次完全由小分子诱导的神经细胞是 2015 年 Dai 等人^[9] 用 6 个确定的化合物完成的, 他们的转化效率能达到 80%, 而且不受细胞来源的年龄和培养代数的影响。3 个月后, 中国科学院上海生命科学研究院裴刚实验室也发表文章, 表明他们用了 7 个化合物将正常人和阿尔茨海默病患者的皮肤细胞诱导成了神经元细胞^[10]。同时, 同济大学仁济医院的 Xu 等人^[11] 在神经营养因子 3 基因修饰的嗅鞘细胞的条件培养基中加入 SB431542, GDNF 和 RA 3 种小分子化合物, 经过 3 周的培养, 成功地将小鼠的成纤维细胞转变成为了氨基酸能神经元。这种神经元的损伤或缺乏可以导致癫痫和自闭症谱系神经障碍。

3.2 microRNA 诱导

microRNA 作为内源基因编码的非编码单链分子, 不翻译成蛋白质, 但参与转录后基因表达调控, 在细胞增殖和细胞周期调控中起着重要作用, 可以诱导多种细胞的转分化。Yoo 等人^[12] 的研究表明, miR-9/9*-124 在神经元细胞命运决定中起重要作用, 过表达它们可以使人的成纤维细胞转换成为神经元细胞, *NEUROD2*, *ASCL1* 和 *MYT1L* 可以促进这个过程。Zhou 等人^[13] 发现, 过表达多能性干细胞特异性 miRNA 簇 miRNA-302/367 和另外两个神经特异性 miRNA, 包括 miRNA-9/9* 和 miRNA-124 可以诱导成纤维细胞转化为神经元。Xue 等人^[14] 则发现, 通过 miR-124 抑制单个 RNA 结合多聚嘧啶序列结合蛋白 (polypyrimidine tract binding protein, PTB) 可以诱导人成纤维细胞转分化为功能性神经元。

4 间接转分化

由于终末的或半终末的细胞直接转分化存在一些缺陷, 终末细胞扩增能力有限, 分化效率比较低, 而且移植后的存活率以及功能性整合率都比较低, 所

以人们又倾向于采用间接转分化的方法,就是将一种成熟细胞重编程成为一种具有可塑性的中间状态,如干细胞或前体细胞,然后再诱导成所需要的功能细胞。

4.1 诱导神经干细胞

诱导神经干细胞(induced neural stem cells, iNSCs)具有很强的可塑性和分化再生的能力,并且可以抗炎抗凋亡,具有免疫调节的作用。Thier等人^[15]在小鼠成纤维细胞中通过先短暂表达*Oct4*,再持续高表达*Sox2*, *Klf4*和*c-Myc*,得到了可以在体外传代超过50代的iNSCs,这些iNSCs与神经干细胞NSCs有着类似的表型和基因型,并可以分化成为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

4.2 诱导神经前体细胞

中国科学院Wang等人^[16]在人体的尿液上皮细胞中利用随体过表达4个Yamanaka因子, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*和*c-Myc*,并在诱导期间的不同时间段加入6个小分子化合物,结果得到了类似于神经干细胞的诱导神经祖细胞(induced neural progenitor cells, iNPCs),这些非转基因的诱导神经祖细胞可以自我更新并在体外分化成多种神经元和神经胶质细胞,并可在新生小鼠的脑中移植成活和分化。

Lim等人^[17]在小鼠成纤维细胞中过表达*Bcl-xL*和*Myt1L*可将其诱导成为诱导神经前体细胞,这种iNPCs可以扩增超过100倍,在过表达*Nurr1*和*Foxa2*后产生具有突触前神经元功能的成熟的中脑多巴胺神经元,并在帕金森氏病模型小鼠的治疗上有

一定的潜力。

4.3 神经限制性前体细胞

鉴于诱导神经干细胞和诱导神经前体细胞在移植后增殖能力有限、存活率低,而且主要分化方向是神经胶质细胞,只有很少量的细胞可以分化为有功能的神经元,Tian等人^[18]通过异位表达*Brn2*, *Sox2*和*Foxa2*将小鼠成纤维细胞转分化成为神经限制性前体细胞,这种细胞只向神经元分化,并且有较强的再生和迁移能力,在帕金森病模型鼠大脑移植后可以缓解功能性运动障碍,并减少纹状体DA神经元轴突目的地的损失。而且最重要的是在移植后的小鼠大脑中检测不到星形胶质细胞和肿瘤。

5 结语

目前,皮肤细胞(成纤维细胞)已经可以成功地被转化成各种神经细胞,而且这些细胞在动物实验中也可以产生一定的功能,但是要走向临床还存在着不少的问题,如转分化的细胞的免疫原性,转分化药物(小分子化合物)的毒性,转化效率以及移植的存活率,以及它们与机体原有的神经细胞如何整合等,还有很多的研究工作需要进一步进行。其中导入特定基因的方法效率较高,但有较高的成瘤性危险,引入合成mRNA诱导或用小分子诱导的方法可以避免病毒引起的基因组整合,可以提高转化的安全性,是未来这一领域的发展趋势。同时,对皮肤细胞的转分化的研究,也有助于了解细胞命运决定以及生物发育的深层规律,为进一步的研究工作打下基础。

参考文献

- 1 Vogel G. How can a skin cell become a nerve cell? *Science*, 2005, 309: 85
- 2 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang Z P, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, 463: 1035–1041
- 3 Ambasudhan R, Talantova M, Ding S, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 113–118
- 4 Dell'Anno M T, Caiazzo M, Leo D, et al. Remote control of induced dopaminergic neurons in parkinsonian rats. *J Clin Invest*, 2014, 124: 3215–3229
- 5 Son E Y, Ichida J K, Wainger B J, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 205–218
- 6 Caiazzo M, Giannelli S, Valente P, et al. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Rep*, 2015, 4: 25–36
- 7 Yang N, Zuchero J B, Ahlenius H, et al. Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 434–439

-
- 8 Thoma E C, Merk1 C, Heckel T, et al. Chemical conversion of human fibroblasts into functional Schwann cells. *Stem Cell Rep*, 2014, 3: 539–547
 - 9 Dai P, Harada Y, Takamatsu T. Highly efficient direct conversion of human fibroblasts to neuronal cells by chemical compounds. *J Clin Biochem Nutr*, 2015, 56: 166–170
 - 10 Hu W, Qiu B, Guan W, et al. Direct conversion of normal and Alzheimer's disease human fibroblasts into neuronal cells by small molecules. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 204–212
 - 11 Xu H, Wang Y, He Z, et al. Direct conversion of mouse fibroblasts to GABAergic neurons with combined medium without the introduction of transcription factors or miRNAs. *Cell Cycle*, 2015, 14: 2451–2460
 - 12 Yoo A S, Sun A X, Li L, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, 2011, 476: 228–231
 - 13 Zhou C, Gu H, Fan R, et al. MicroRNA 302/367 cluster effectively facilitates direct reprogramming from human fibroblasts into functional neurons. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 2746–2755
 - 14 Xue Y C, Ouyang K, Huang J, et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell*, 2013, 152: 82–96
 - 15 Thier M, Wörsdörfer P, Lakes Y B, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 2012, 10: 473–479
 - 16 Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods*, 2013, 10: 84–89
 - 17 Lim M S, Chang M Y, Kim S M, et al. Generation of dopamine neurons from rodent fibroblasts through the expandable neural precursor cell stage. *J Biol Chem*, 2015, 290: 17401–17414
 - 18 Tian C H, Li Y, Huang Y, et al. Selective generation of dopaminergic precursors from mouse fibroblasts by direct lineage conversion. *Sci Rep*, 2015, 5: 12622



裴端卿

研究员，博士生导师，中国科学院广州生物医药与健康研究院院长。国家杰出青年科学基金获得者，国家自然科学基金委“干细胞多能性与体细胞重编程”创新研究群体带头人，人类基因编辑研究小组(Human Gene Editing Study Committee)成员。新世纪百千万人才工程国家级人选，中国科学院“百人计划”人才，广东省南粤百杰人才奖获得者。获国家自然科学奖二等奖和广东省科学技术奖一等奖两项。

Summary for “皮肤细胞如何成为神经细胞?”

How can a skin cell become a nerve cell?

PEI DuanQing

Guangzhou Institute of Biomedicine and Health (GIBH), Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China

E-mail: pei_duanqing@gibh.ac.cn

How can a skin cell become a nerve cell? This is one of the 125 big questions raised in *Science* magazine for its 125th anniversary. Here we summarize what we know on this subject. In particular, we discuss recent success in converting fibroblasts, one of the common cells found in skin, into nerve cells including neuron. Despite these successes in making nerve cells of skin cells in laboratory, it is quite challenging in translating these breakthroughs into success in clinic.

The nervous system includes the central nervous system, the peripheral nervous system and the autonomic nervous system. Many insults, including infection, poisoning, immune damage, nutritional disorders, endocrine disorders and genetic factors, may damage the nervous system such that nerve cells undergo degeneration, apoptosis, or necrosis, leading to neurological impairments. The impairments in peripheral nerve system may be repaired without much defects with skilled microsurgical techniques. However, options are quite limited in repair lesions in the central nerve system as it was known that neurons in the central nervous system (CNS) could not regenerate after damage and would only be replaced by glial cells.

Neuronal stem cells hold great promise in repairing lesions in the nerve systems. While embryonic stem cells may be complicated with ethical issues, adult stem cells such as neuronal stem cells are difficult to isolate and purify, with limited differentiation capacity. One solution is the induction of neuronal cells from skin fibroblast directly. Indeed, in 2010, Vierbuchen et al. use three transcription factors, *Ascl1*, *Brn2/4* and *Myt1L* (ABM), to directly convert fibroblasts into induced neurons (iNs). Because fibroblasts are easy to obtain, they have become the first choice of the initial cells to induce nerve cells. This technology has become an active area of research in recent years.

Going forward, it is possible to apply many similar strategies including transcription factors, small molecules, microRNAs to the induction of neuron, glial cell, astrocyte oligodendrocyte and Schwann cells from fibroblast. The cells generated from these strategies can be used to treat Parkinson's disease and Amyotrophic lateral sclerosis. There is a bright future for the generation of nerve cells from skin cells. In deed, similar approaches have been attempted in animal models. For human therapy, we must perform more safety tests, improve efficiency and enhance survival rate. Therefore, we need a lot of work done in clinical practice.

Most importantly, the investigation of nerve cell generation from skin fibroblast may help us to understand the basic rules and laws of cell fate determination and the mechanism for human developments. Current work is laying a solid foundation for the development of therapies.

fibroblast, induced neurons, induced neuron stem cell

doi: 10.1360/N972017-00536