

# 热点话题

Hot topics

## 干细胞生物学家： 生物学研究领域不可小觑的力量



小鼠成纤维细胞表达几个转录因子之后就能重编程成为具有功能的神经元细胞。

### 发

育生物学家一直以来都认为生物发育分化是单向的、不可逆的过程，它有着固定的表观遗传模式。但是最近在干细胞生物学研究领域里取得的科研进展表明，至少在某些特定的条件下，成熟的成体细胞会因为某些外源性的因子改变而改变自身的细胞类型。比如最近Vierbuchen在《自然》（*Nature*）杂志上发表的那篇文章就表明，中胚层来源的细胞，比如成纤维细胞在表达了几种转录因子之后就会转变成外胚层来源的细胞——比如神经元细胞。这项研究成果给神经组织再生研究带来了新希望，而且还说明利用细胞重编程技术可以获得各种我们所需要的细胞，这对于再生医学和药物开发来说无疑是一大福音。

每一种体细胞都能够再生成为一个完整的生命体，这一理论来自最新的克隆研究成果。人们最开始是在两栖动物中发现了这一现象，后来又推广到了哺乳动物。研究表明，只需要在终末分化细胞当中外源表达Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc这四种转录因子，就可以将其“推回”到多潜能状态，这一发现一方面证实了上述体细胞能再生出完整生命体的理论，另一方面也让生物学家们开始重新思考细胞分化的问题。尤其是只用4个转录因子就能得到诱导性多潜能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS）这一事实，让生物学家们不得不重新开始慎重地审视体细胞的可塑性问题。

因为iPS细胞能够分化成为体内各种组织细胞，因此它们是一种非常好的自体细胞，可以广泛地应用于细胞疗法。还有一种办法也能获得我们想要的细胞，那就是谱系重编程方法（lineage reprogramming），即将一种已分化的成熟细胞转化成另一种已分化的成熟细胞的技术。有人在胰腺腺泡细胞（pancreatic acinar cell）当中表达转录因子Pdx1、Ngn3 和MafA从而成功地将它转化成为胰岛β细胞（beta-islet cell）；还有人在非感受性耳蜗细胞（nonsensory cochlear cell）当中表达Atoh1蛋白之后将其转变成了具有听觉功能的毛细胞（auditory hair cell）；而B淋巴细胞表达C/EBP之后也能转变成巨噬细胞（macrophage）。在神经细胞重编程过程中只需使用神经细胞特异性的转录因子Pax6、Ngn2、Ascl1（又名Mash1），就可以将星形胶质细胞（astroglial cell）转化成神经元细胞；在神经元前体细胞（neural progenitor）中表达Nurr1、Ngn2 和Mash1则能够获得多巴胺能神经元细胞（dopaminergic neuron）。

Vierbuchen最初归纳整理出了19种已知的在发育过程当中能够对神经元细胞起到共调控（co-regulate）作用的非常重要的转录因子。随后，Vierbuchen他们将这19种转录因子的全部以及其中某几种转录因子的组合，用病毒做载体转染了小鼠胚胎细胞和取自3天大小能够表达绿色荧光蛋白GFP的小鼠尾尖的成纤维细胞，同时转染Tau基因作为对照。Vierbuchen等人对各种排列组合进行试验之后发现，只需要Ascl1、Brn2/4、Myt1l、Zic1和Olig2这五种转录因子就能够将成纤维细胞转化成能表达GFP蛋白的神经元细胞，他们将这种神经元细胞称为诱导性神经元（induced neuronal, iN）细胞，而其中一定需要的只有Ascl1。Brn2以及Myt1l或者Zic1只能提高转化的效率，促进细胞成熟并形成更为复杂的神经细胞表型。同样，在制备iPS细胞时也能用增加外源转录因子个数的方法来提高成功率。

Vierbuchen小组发现有些神经递质能够刺激iN细胞出现兴奋性麸氨酸神经元（excitatory glutamatergic neuron）和抑制性γ-氨基丁酸能神经元（inhibitory GABAergic neuron）才会有特征，不过不能表现出中枢神经系统里定位比较局限的多巴胺能神经元、胆碱能神经元和5-羟色胺能投射神经元的特质。重要的是，纯化的iN细胞能够重复诱发动作电位，形成功能性突触。对这种突触的活性进行检测后发现iN细胞具有兴奋性皮质神经元细胞的特征。这些iN细胞中绝大多数都能很快形成突触，并表现出特征性的电生理学特性。不过我们还是不清楚iN细胞究竟能不能形成一个完整的、稳定的表型；或者在经历过不完整的神经细胞重编程之后能得到一个部分完整的成纤维细胞。

不过这项研究可能存在一个小问题，那就是研究人员只使用了小鼠胚胎细胞和新生小鼠尾尖的成纤维细胞作为实验材料。虽然目前没有证据表明这些细胞能够形成神经细胞，但是在胚胎发育过程中，神经管嵴（neural crest）来源的细胞有可能会从神经管迁徙进入周围组织从而渗入很多皮肤结构当中。实际上，这些细胞的确能够作为多向分化潜能的皮肤前体细胞一直存在，直至机体发育成熟。为了判断究竟是这些微量的神经嵴来源细胞还是成纤维细胞对Ascl1等重编程因子做出了反应，我们最应该采用克隆研究的方法，并且利用分子标志物来进行辨别。有趣的是，Sox10这种早期神经管嵴细胞分子标志物也能在小鼠尾尖成纤维细胞上表达。不过科研人员们也不能完全排除iN细胞有可能是背根神经节细胞（dorsal root ganglion）或者是外周神经系统（peripheral nervous system）交感神经元细胞的可能性，因为在某些iN细胞上也表达有外周蛋白（peripherin，一种中间丝蛋白，最初发现于神经元）。如果真是这样，就更加说明是神经嵴来源的细胞“污染”了用来制备iN细胞的成纤维细胞。

不过如果iN细胞真的来源于已分化的成纤维细胞，那么就真有必要好好研究一下这其中的重编程机制了。Vierbuchen小组以及最近刚刚发表了一篇评论的科研小组都认为，一定有某

种直接转化作用能够将中胚层来源的细胞转化成外胚层来源的细胞。或者是在Ascl1以及其它转录因子的作用下，已分化细胞能够暂时先退回到初级状态（注意不是多向分化潜能状态），然后再改变分化方向，分化成另一种细胞。完全分化的成纤维细胞似乎不太可能改变自身“命运”，变成完全分化的神经元细胞，不过成纤维细胞倒有可能先退回到神经元前体细胞状态。Vierbuchen等人并没有检查细胞在重编程过程中的分裂情况。成纤维细胞在Ascl1作用下转化成神经元细胞之前有没有分裂呢？这可能就会“重置”细胞的表达模式，使其回到更加初级的状态，这样其它一些外源性转录因子才能发挥作用。在细胞重编程过程中对Pax6或Tbr2等神经前体细胞分子标志物进行检测，或者观察细胞增殖的抑制情况都能有助于判断细胞来源及转化情况。



图1 胚胎发育及细胞重编程过程的弹珠球模型。该模型的基本机制就是在重编程过程中，被重编程的细胞需要先经历一个去分化过程，退回到比较初级的阶段，然后改变分化方向分化成另一种细胞。如图中右侧底部的发射台所示，受精卵（即弹珠球）在上升过程中经历了几轮分裂之后形成了全能性干细胞，随后会继续分化形成各种胚胎细胞和胚外细胞。随着弹珠球在轨道中继续上升，在胚泡的内层开始出现了胚胎干细胞。这种胚胎干细胞在各种“缓冲器（即内源性转录因子）”的作用下开始自我更新，但同时仍旧保持了多向分化的潜能。随着弹珠球继续上升，它的分化潜能逐渐减弱，在各种因素的作用下开始定向地向三大分化方向进行分化。各种内源性转录因子和外源性转录因子（即挡板）可以控制细胞继续向前分化，但是在某些情况下（如图中红色箭头所示）也能够把细胞“弹回”到分化程度略低的阶段。完全分化的细胞（图中棕色所示）在图中最底部最大的（即表达量最大）橙色挡板（即Oct4和Sox2）的强力作用下也能形成iPS细胞，从而回到多向分化潜能状态。其它一些较小的挡板（表达量也略低，作用不如Oct4和Sox2强）则只能将细胞退回一点点，不如Oct4和Sox2的作用大。还有一种模型认为已分化细胞可以不用退回到未分化状态，直接转变成另一种细胞，这种理论即转分化理论（transdifferentiation）。

为了形象地解释细胞重编程过程的机制，我们绘制了图1这张弹珠球模型图。在C.H. Waddington的经典模型理论里，正在分化的细胞就好像沿着表观遗传势能斜坡（epigenetic landscape）在山谷中滚落的巨石。而在我们这个更加互动的模型里，弹珠球（细胞）会在上升轨道里经历从最初的受精卵状态到后来的胚泡状态以及多潜能状态等等。当弹珠球到达弹珠台顶部开始下落之后，它们就会分化形成三个胚层的细胞。而这些细胞究竟是分化形成外胚层细胞、中胚层细胞还是内胚层细胞，则取决于它们在弹珠台中碰到的各种缓冲器和挡板共同作用的结果。图中的缓冲器代表各种内源性转录因子，而挡板则代表各种外源性转录因子。在各种挡板的作用下，细胞能够克服表观遗传势能，回到更加初级的分化状态，即弹珠台的上半部分，甚至是成为iPS细胞。有一些重要的转录因子，比如Oct4挡板（图中最底部的橙色挡板）的力量非常大，能把细胞推回到弹珠台的顶部，而其它一些谱系特异性的转录因子（即小挡板）的力量就要小得多，只能在弹珠台的某一个轨道区域里（即一个胚层和谱系）发挥作用。

在Vierbuchen小组最近开展的这项工作中，“理论上的（如前文所述，不能排除混杂有神经管嵴来源细胞的可能性）”中胚层成纤维细胞能够在Ascl1、Brn2和Myt1l等转录因子（即图中的蓝色挡板）的作用下转化成外胚层来源的神经细胞。为了简化起见，我们在图中只列举了另外两个重编程例子，即iPS细胞和同属于内胚层来源的胰腺内分泌腺细胞转化成胰腺外分泌细胞的例子。

不过还有一种理论也能解释细胞的重编程现象，该理论认为细胞不需要先退回到分化程度较低的阶段，而是可以直接从一种细胞转换成另一种细胞。将来我们还需要对这两种重编程理论进行比较和研究，探讨究竟哪种理论更加正确，这一定会是一项很有意思的工作。随着科技的发展，这也是必须弄清楚的一大问题。

当然，更重要的工作还是如何更好地利用细胞重编程技术改进细胞医疗水平，从而造福人类。正如我们图中所示的胰腺细胞重编程以及其它例子，比如耳部细胞重编程等等都能马上应用到I型糖尿病患者或者失聪患者人群当中。在体内进行这种重编程操作可以保证获得的胰腺β细胞和具有听觉功能的毛细胞都能够定位在恰当的位置，但是如果在体内进行将成纤维细胞重编程为神经元细胞的操作，可能就不会得到这么好的定位效果和治疗效果了。不过体外制备神经元细胞或神经元前体细胞作为移植物来源或许是条行得通的办法。而且如果真的能够利用患者自身的成纤维细胞得到目的细胞，而不经历多向分化潜能阶段的iPS细胞，那么就能避免iPS细胞等可能造成的致癌隐患了。不过对于大多数的临床实践来说还是需要制备大量的细胞，这样才能满足临床细胞移植的需要。因此我们还需要进行更深入的研究，看看Vierbuchen他们采用的这种实验方法是否能够制备出大量的神经前体细胞。

不论细胞重编程领域将来会发展成什么样子，毫无疑问，干细胞生物学家一定会起到重要的作用。

原文检索：

Dhruv Sareen & Clive n Svendsen. (2010) Stem cell biologists sure play a mean pinball. *Nature Biotechnology*, 28(4):333-335.