

利用诱导性多能干细胞技术研究环境致病因素 诱导帕金森病发病的进展

白莹, 徐斌

摘要: 帕金森病是一种十分普遍的中枢神经系统退行性疾病, 以中脑黑质纹状体多巴胺能神经元丢失为主要特征, 诱发因素较多。本文简述帕金森病的环境及职业致病因素和诱导性多能干细胞(iPSCs)技术的研究进展, 并分析了iPSCs技术在研究环境、职业致病因素诱导帕金森病发病机制中的应用前景, 提出了将iPSCs技术应用于研究帕金森病的发病机制具有重要意义。

关键词: 帕金森病; 诱导性多能干细胞; 环境致病因素; 职业致病因素; 发病机制

New Progress in Research on Environmental Pathogenic Factors of Parkinson's Disease Using Techniques of Induced Pluripotent Stem Cells BAI Ying, XU Bin (Department of Environmental Health, School of Public Health, China Medical University, Liaoning 110001, China). Address correspondence to XU Bin, E-mail: xubin@mail.cmu.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: Parkinson's disease is a common central nervous system degenerative disease, characterized by the loss of dopaminergic neuron in the substantia nigra and striatum of midbrain, which can be induced by various factors. The current paper sketches about environmental and occupational risk factors of Parkinson's disease and the latest progress of the induced pluripotent stem cells (iPSCs) technology, analyses the application prospects of iPSCs in the pathogenesis research of Parkinson's disease induced by environmental and occupational risk factors, and proposes its potential significance in this area.

Key Words: Parkinson's disease; induced pluripotent stem cell; environmental pathogenic factor; occupational pathogenic factor; pathogenesis

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种十分普遍的运动障碍慢性疾病,常合并有行为或心理的异常,严重影响患者的生存质量。随着老龄化社会的到来,神经退行性疾病的发病率正日益增高,PD将成为21世纪威胁人类健康的最严重的疾病之一。近几年对PD的病因及发病机制的研究尚无突破性进展,主要研究方向集中在以下几个方面:年龄因素、环境毒素、遗传因素、神经系统老化、细胞凋亡等。本文主要就PD的环境、职业致病因素及利用诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)建立PD发病模型来研究这些环境及职业致病因素进行综述。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14356

[基金项目]国家自然科学基金项目(编号:81372942,81102098)

[作者简介]白莹(1991—),女,硕士生;研究方向:环境神经毒理学;

E-mail: 645102831@qq.com

[通信作者]徐斌, E-mail: xubin@mail.cmu.edu.cn

[作者单位]中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室,辽宁110001

1 PD的环境及职业致病因素

1.1 金属元素

有研究发现,某些重金属,比如锰的慢性中毒可损害中枢神经系统^[1],特别是纹状体和苍白球等部位,产生类似PD的锥体外系神经功能障碍。Guilarte等^[2]及Huang^[3]的研究也发现锰中毒与PD有着密切的联系。Park^[4]发现电焊工及其他长期暴露于锰的工人存在着出现神经症状和罹患PD的危险性。Moberly等^[5]的研究还表明,锰可以通过作用于嗅球和基底神经节的多巴胺能神经元来影响神经介质的释放,从而导致PD等锥体外系疾病的发生。Coon等^[6]利用K-XRF技术测量了慢性暴露条件下铅在人体内的沉积量,并表明长期的铅暴露与PD发病风险成正相关。Komatsu等^[7]证实了锰、铁、铅、镉、铝等金属在体内的沉积会导致氧化应激的增加,从而引起PD的发生。

1.2 农药

百草枯对多巴胺系统具有神经毒性作用,从而导

致PD样症状和改变^[8]。Betarbet等^[9]利用鱼藤酮复制出了类似PD的大鼠模型,其症状包括出现震颤、步态不稳等。某些PD患者的脑组织中所含有机氯农药,如林丹、狄氏剂的水平明显高于对照组。代森锰(一种杀真菌剂)也被报道与PD的发生相关^[10]。还有研究发现,有机磷农药同样与PD的发病相关^[11]。

1.3 环境毒素

1983年,美国有人吸食了含有1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)的海洛因后出现了典型的PD症状和病理学改变,研究者受到启发用灵长类复制了MPTP的PD动物模型^[12]。研究人员经过实验证实,MPTP对多巴胺能系统具有神经毒性从而导致PD样症状和改变^[13-14]。此后,MPTP的PD模型开始被应用于试验中^[15]。另外,Shepherd等^[16]发现,MPTP还可明显增强百草枯对多巴胺能系统的损害。

1.4 其他因素

PD的发病还与很多种因素相关。有学者经过研究发现,摄入过多的脂肪,罹患PD的概率也会增加^[17]。Miyake等^[18]发现摄入花生四烯酸和胆固醇会增加PD的发生概率。Kyrozis等^[19]通过对希腊人饮食习惯的研究发现饮用牛奶也和PD发病有关。Kotagal等^[20]发现高血压等心血管危险因素与PD发生具有一定相关性。Aryal等^[21]还发现,四氢生物蝶呤(BH₄)等增加会导致PD初期病情的恶化。Willis等^[22]发现居住环境与PD的发生也有一定关系。

2 PD发病机制的研究手段及应用进展

2.1 概况

当前的PD研究手段包括动物模型,细胞模型和iPSCs模型等。动物模型为PD发病机制最早的研究方式。Maneuf等^[23]早在20世纪50年代就通过对啮齿类动物注射利血平的方法使其产生类似人类的PD样症状。此后研究者们又相继积极研发出了6-羟多巴胺模型^[24],百草枯模型^[25]等。基因敲除和转基因小鼠模型^[26]在PD研究中也应用。细胞模型包括肾上腺嗜铬瘤细胞系(pheochromocytoma cells, PC12)细胞模型^[27],SH-SY5Y细胞模型^[28]等。大脑结构复杂性的缺乏和较短的模型寿命意味着小鼠等动物模型难以详尽地阐释人类的疾病,细胞模型也并没有可靠地显示出在PD患者身上所观察到的缓慢的疾病进程。近几年,新兴的iPSCs技术,将来源于PD病人的iPSCs

可分化为中脑多巴胺能神经元,在体外模拟其生理特性,可方便研究人员在更接近人体内环境的条件下研究PD的发病机制。

2.2 iPSCs技术的发展

iPSCs技术是干细胞领域近几年来比较热门的一种新兴干细胞技术。该技术通过病毒载体或其他特异载体将特定转录因子的组合转入到被诱导细胞中,进而将已分化的体细胞重编程为未分化的多能细胞。2006年Takahashi^[29]成功将小鼠成纤维细胞重编程为与胚胎干细胞特征相似的诱导性胚胎干细胞,即iPSCs。他利用逆转录病毒将4个与多能性相关的基因*Oct-4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*组合导入被诱导细胞,再经过多能性分子Fbx15筛选,从而得到在多方面与胚胎干细胞很相似的多能性细胞。随后成功诱导出iPSCs^[30-31]。2008年Nakagawa^[32]研究小组使用了*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4* 3个基因,避免了原癌基因*c-Myc*的插入使得iPSCs更安全化,利用Nanog代替Fbx15作为筛选标记,从而进一步提高了筛选的特异性。2009年,Woltjen^[33]研究小组以转位子为载体代替了逆转录病毒,所得到的iPSCs避免了病毒基因的顽固表达和插入突变等风险,从而使得临床应用风险进一步大大降低。另外,直接将重组蛋白质导入体细胞^[34]以及利用合成mRNA进行转染^[35]等方法也显著降低了突变的危险性。有报道称体细胞可以通过小分子复合物而不依靠病毒来实现重编程^[36]。还有研究者发现毛猴素,二甲基五羟色胺和D4476可作为*Oct3/4*的化学替代品^[37]。随着研究的深入,iPSCs技术愈加成熟,不断进展的诱导iPSCs的方法既可有效消除重编程造成的种种潜在危险,又可以简单快速地获得iPSCs。

2.3 利用iPSCs技术进行环境、职业致病因素诱导PD发病机制的相关研究

由于环境因素和遗传因素相互影响的复杂性,环境职业因素对PD作用相关的研究具有一定难度。Aboud等^[38]以无PD遗传危险因素者为对照组,以*PARK2*等位基因功能缺失且具有PD家族史但是还未出现症状者为实验组建立了观察锰神经毒性差异的iPSCs模型。来源于实验组和对照组的真皮成纤维细胞的iPSCs被分别诱导分化为早期神经前体细胞。经过测定发现两组神经前体细胞在对锰毒性的敏感性和线粒体分裂等方面几乎没有差别,但是实验组与对照组相比,活性氧显著升高。经过测定发现实验组与对照组相比,锰在细胞内的沉积明显减少,表明在

锰沉积率相同的条件下实验组神经前体细胞对于锰毒性的敏感性比对照组高。但是锰沉积明显减少的原因是否与 *PARK2* 突变有关尚不清楚。Kikuchi 等^[39]将人体 iPScs 来源的神经前体细胞在无血清、无饲养层条件下培养至 28 d 和 42 d 后分别定向性植入 MPTP 处理过的猴子双侧豆状核, 植入 6 个月后。磁共振成像(MRI)图像显示移植的细胞在猴子的大脑中存活增殖。由于 MRI 图像与猴子脑片苏木精-伊红染色的结果具有一致性, 他们利用 MRI 来观察移植细胞的增殖情况。培养至 28 d 的移植细胞增殖迅速, 而培养至 42 d 的移植细胞增殖相对缓慢。他们还发现移植后 1~3 个月的细胞倍增时间明显短于 3~6 个月, 说明细胞的增殖能力在后期开始下降, 但至少可以在猴脑内存活 6 个月以上。他们又通过描述行为评定量表发现移植后猴子的行为较之前发生了一些进步, 表明人体 iPScs 在未来临床试验中的治疗潜力。Deleidi 等^[40]通过逆转录病毒将人类 *KLF4*, *SOX2*, *OCT4* 和 *c-MYC* 导入恒河猴皮肤成纤维细胞, 获得 iPScs 后进一步将其诱导为多巴胺能神经元细胞并植入 6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的小鼠 PD 模型的纹状体, 移植细胞在移植 16 周后进行组织分析发现具有酪氨酸羟化酶阳性细胞, 且小鼠的纹状体中显示出神经的再生现象。他们还发现这些动物的同侧旋转行为等在移植后均有所恢复, 而且移植 6 个月后这些小鼠既没有产生肿瘤, 也没有发生炎症反应, 进一步证实了 iPScs 在 PD 等神经退行性疾病在临床治疗方面的安全性。Chang 等^[41]的研究证实了二十二碳六烯酸处理过的 iPScs 来源的多巴胺能神经元前体细胞植入到 6-OHDA 诱导的小鼠 PD 模型体内, 小鼠的症状在 4 个月后得到了一定的缓解。Peng 等^[42]将来源于 iPScs 的神经多巴胺能神经元建立起 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)模型和鱼藤酮的 PD 体外模型, 对 44 种可能对 PD 有治疗作用的药物进行了两轮筛选, 并利用具有神经保护作用的神经营养因子作为阳性对照。经过 MPP⁺的初筛和确认筛检, 他们发现其中 16 种药物对于 MPP⁺诱导的神经细胞死亡显示出神经保护作用, 并利用 MPP⁺模型建立起了这 16 种药物的剂量反应曲线。经过鱼藤酮模型的筛检他们更加明确了这些药物对于鱼藤酮诱导的多巴胺能神经元凋亡确实具有一定的保护作用。这种方法可以应用于可能具有临床疗效的 PD 药物的检测来缩短药物进入临床的时间, 并可增加临床实验成功的可能性和个体化治疗的可能性, 为明确

药物疗效提供了良好的平台。

2.4 iPScs 技术面临的问题及展望

iPScs 可用来进行组织功能的研究和新药物的筛选, 也可移植到人体内来治疗遗传或退行性疾病, 而且还避免了免疫排斥及伦理问题。然而, iPScs 技术应用在临床实践前, 仍然面临着一些重要的挑战: (1) iPScs 诱导方法仍存在诸多不足。例如用于重组病毒载体的某些重组基因是致癌基因, 产生的 iPScs 临床安全性不能得到保障。(2) iPScs 向神经细胞分化的过程中具有不一致性和低效率性。(3) 衰老是否可以在 iPScs 来源的细胞中复制是在针对神经退行性疾病的研究中一个难以攻克的问题。尽管有着种种尚未解决的问题, 利用 iPScs 作为神经退行性疾病的模型对于现代医学的研究有着很重要的影响。随着医学研究的深入和研究者们不断的实验和探索, iPScs 技术将会得到更大的发展, 在与小鼠模型、全基因组测序、MRI 等技术结合后, iPScs 技术将在对 PD 等神经退行性疾病多方面的研究中起到举足轻重的作用。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Perl DP, Olanow CW. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2007, 66(8): 675-682.
- [2] Guilarte TR, Burton NC, Mcglothlan JL, et al. Impairment of nigrostriatal dopamine neurotransmission by manganese is mediated by pre-synaptic mechanism(s): implications to manganese-induced parkinsonism[J]. J Neurochem, 2008, 107(5): 1236-1247.
- [3] Huang C. Parkinsonism induced by chronic manganese intoxication-an experience in Taiwan[J]. Chang Gung Med J, 2007, 30(5): 385.
- [4] Park RM. Neurobehavioral deficits and parkinsonism in occupations with manganese exposure: a review of methodological issues in the epidemiological literature[J]. Saf Health Work, 2013, 4(3): 123-135.
- [5] Moberly AH, Czarnecki LA, Pottackal J, et al. Intranasal exposure to manganese disrupts neurotransmitter release from glutamatergic synapses in the central nervous system in vivo[J]. Neurotoxicology, 2012, 33(5): 996-1004.
- [6] Coon S, Stark A, Peterson E, et al. Whole-body lifetime

- occupational lead exposure and risk of Parkinson's disease[J]. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(12): 1872.
- [7] Komatsu F, Kagawa Y, Kawabata T, et al. A high accumulation of hair minerals in Mongolian people: 2nd report; influence of manganese, iron, lead, cadmium and aluminum to oxidative stress, Parkinsonism and arthritis[J]. *Curr aging sci*, 2011, 4(1): 42-56.
- [8] Qi Z, Miller Gw, Voit Eo. Rotenone and paraquat perturb dopamine metabolism: A computational analysis of pesticide toxicity[J]. *Toxicology*, 2014, 315: 92-101.
- [9] Betarbet R, Sherer TB, Mackenzie G, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease [J]. *Nat neurosci*, 2000, 3(12): 1301-1306.
- [10] Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, et al. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Panayiotidis MI*[J]. *Chem Biol Interact*. 2010, 188(2): 289-300.
- [11] Slotkin TA, Seidler FJ. Developmental exposure to organophosphates triggers transcriptional changes in genes associated with Parkinson's disease *in vitro* and *in vivo*[J]. *Brain Res Bull*, 2011, 86(5/6): 340-347.
- [12] Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis[J]. *Science*, 1983, 219(4587): 979-980.
- [13] Rojo AI, Montero C, Salazar M, et al. Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 24(7): 1874-1884.
- [14] Prediger RDS, Aguiar Jr AS, Rojas-Mayorquin AE, et al. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease[J]. *Neurotox Res*, 2010, 17(2): 114-129.
- [15] Wang D, Du X, Zheng W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders[J]. *Toxicol Lett*, 2008, 176(1): 40-47.
- [16] Shepherd KR, Lee E SY, Schmued L, et al. The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2006, 83(3): 349-359.
- [17] Chen H, Zhang SM, Hernán MA, et al. Dietary intakes of fat and risk of Parkinson's disease[J]. *Am J Epidemiol*, 2003, 157(11): 1007-1014.
- [18] Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, et al. Dietary fat intake and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan[J]. *J Neurol Sci*, 2010, 288(1/2): 117-122.
- [19] Kyroziis A, Ghika A, Stathopoulos P, et al. Dietary and lifestyle variables in relation to incidence of Parkinson's disease in Greece[J]. *Eur J Epidemiol*, 2013, 28(1): 67-77.
- [20] Kotagal V, Albin RL, Müller ML, et al. Modifiable cardiovascular risk factors and axial motor impairments in Parkinson disease [J]. *Neurology*, 2014, 82(17): 1514-1520.
- [21] Aryal B, Lee JK, Kim HR, et al. Alteration of striatal tetrahydrobiopterin in iron-induced unilateral model of Parkinson's disease[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18(2): 129-134.
- [22] Willis AW, Sterling C, Racette BA. Conjugal Parkinsonism and Parkinson disease: A case series with environmental risk factor analysis[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2010, 16(3): 163-166.
- [23] Maneuf YP, Duty S, Hille CJ, et al. Modulation of GABA transmission by diazoxide and cromakalim in the globus pallidus: implications for the treatment of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(1): 12-16.
- [24] Kobylecki C, Crossman AR, Ravenscroft P. Alternative splicing of AMPA receptor subunits in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia[J]. *Exp Neurol*, 2013, 247: 476-484.
- [25] Allen JL, Liu X, Weston D, et al. Consequences of developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particle air pollution combined with the adult paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype in male mice[J]. *Neurotoxicology*, 2014, 41: 80-88.
- [26] Prasad K, Tarasewicz E, Ohman Strickland PA, et al. Biochemical and morphological consequences of human α -synuclein expression in a mouse α -synuclein null background [J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 33(4): 642-656.
- [27] Zhang L, Chang M, Li H, et al. Proteomic changes of PC12 cells treated with proteasomal inhibitor PSI [J]. *Brain Res*, 2007, 1153: 196-203.
- [28] Asci R, Vallefucio F, Andolfo I, et al. Trasferrin receptor 2 gene regulation by microRNA 221 in SH-SY5Y cells treated

- with MPP⁺ as Parkinson's disease cellular model[J]. *Neurosci Res*, 2013, 77(3): 121-127.
- [29] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [30] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(5): 877-886.
- [31] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-146.
- [32] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 101-106.
- [33] Woltjen K, Michael IP, Mohsen IP, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-770.
- [34] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(6): 472-476.
- [35] Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(5): 618-630.
- [36] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. *Science*, 2013, 341(6146): 651-654.
- [37] Sachamitr P, Hackett S, Fairchild PJ. Induced pluripotent stem cells: challenges and opportunities for cancer immunotherapy[J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 176.
- [38] Aboud AA, Tidball AM, Kumar KK, et al. Genetic risk for Parkinson's disease correlates with alterations in neuronal manganese sensitivity between two human subjects[J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33(6): 1443-1449.
- [39] Kikuchi T, Morizane A, Doi D, et al. Survival of human induced pluripotent stem cell-derived midbrain dopaminergic neurons in the brain of a primate model of Parkinson's disease[J]. *J Parkinsons Dis*, 2011, 1(4): 395-412.
- [40] Deleidi M, Hargus G, Hallett P, et al. Development of histocompatible primate-induced pluripotent stem cells for neural transplantation[J]. *Stem Cells*, 2011, 29(7): 1052-1063.
- [41] Chang YL, Chen SJ, Kao CI, et al. Docosahexaenoic acid promotes dopaminergic differentiation in induced pluripotent stem cells and inhibits teratoma formation in rats with Parkinson-like pathology[J]. *Cell Transplant*, 2012, 21(1): 313-332.
- [42] Peng J, Liu Q, Rao MS, et al. Using human pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons to evaluate candidate Parkinson's disease therapeutic agents in MPP⁺ and rotenone models[J]. *J Biomol Screen*, 2013, 18(5): 522-533.

(收稿日期: 2014-05-15)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 郑轻舟)