

· 综述 ·

建立骨质疏松症 iPS 细胞的重要性及其应用前景

石梦琪 刘文佳 张立强*

第四军医大学口腔医学院, 西安 710032

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 06-0726-04

摘要: 骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨强度下降、骨折危险性增加为特征,受遗传和环境因素共同作用的复杂疾病。目前 OP 的发病率逐年升高,严重影响了老年人的健康。然而由于发病机制尚不明确,药物治疗还存在周期长、费用高、不良反应多等问题。近年来诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)技术的诞生为 OP 的防治开创了新平台。研究报道 iPS 细胞模型已成功用于帕金森病、阿尔茨海默症、精神分裂症、脊髓损伤等众多疾病,建立 OP 的 iPS 细胞模型将有助于在其致病机制研究和药物筛选中取得新突破。这篇综述主要介绍建立 OP 的 iPS 细胞模型的重要性,并预测它在 OP 的基础研究与临床治疗上的应用前景。

关键词: 骨质疏松症;诱导多功能干细胞;疾病模型;应用前景

The importance of the establishment of induced pluripotent stem cells and its therapeutic potential in osteoporosis

SHI Mengqi, LIU Wenjia, ZHANG Liqiang

School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

Corresponding author: ZHANG Liqiang, Email: qianglizhang110@126.com

Abstract: Osteoporosis (OP) is a complex disease characterized by descending of bone strength and increasing of bone fracture risk, which is associated with genetic and environmental factors. Currently the incidence of osteoporosis has risen year by year, which severely influences the health of the elderly. However, the pathogenic mechanism of OP is not clear, and there still remain many problems in drug therapies, such as long treatment cycle, high cost, and many adverse drug effects. Recently the emergence of induced pluripotent stem (iPS) cells creates a novel platform for OP. It is reported that iPS cells have been successfully used in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Schizophrenia, spinal cord injury and so on. Modeling the osteoporosis with iPS cells will help to make some vital breakthroughs in the research of pathogenic mechanism and drug screening. This review describes the importance of modeling the osteoporosis with iPS cells and predicts its potentials in the basic experimental research and clinical treatment.

Key words: Osteoporosis (OP); Induced pluripotent stem (iPS) cells; Disease model; Application prospect

骨质疏松症是以骨量减少、骨组织微细结构改变为特征的一种全身性骨骼疾病,伴有骨脆性和骨折危险性的增加,受到遗传、衰老、激素、细胞因子、营养状况、内分泌等多因素影响^[1]。目前,骨质疏松症的诱因和发病机制还不明确,仍缺乏有效根治的方法。药物治疗作为治疗骨质疏松症的主要方法,也只能促进局部骨形成、抑制骨吸收,而且存在治疗周期长、副作用多、易耐受等弊端。因此骨质疏松症的治疗问题仍是当前研究的热点之一。最近有学者将焦点转向新兴的 iPS 细胞技术,这不失为一

个创新又有发展前景的新思路。iPS 细胞是一种具有胚胎干细胞样自我更新和多向分化潜能的诱导多功能干细胞,已先后成功用于脊髓损伤^[2]、阿尔茨海默病^[3]、LEOPARD 综合征^[4]、帕金森病^[5]、糖尿病^[6]等多种复杂疾病的研究。以此为参考,利用 iPSCs 建立 OP 患者的疾病模型,将实现从基因、分子水平研究发病机制、进行药物筛选和毒性检测。如今 iPS 细胞理论基础研究和实验技术已日臻完善,重编程效率和安全性也有了极大提高,虽然至今还没有将该技术应用于骨质疏松症的报道,但其可行性与巨大应用价值是可以肯定的。本综述将介绍建立 OP 的 iPS 细胞模型的必要性与可行性,以及

*通讯作者: 张立强, Email: qianglizhang110@126.com

iPS 细胞在治愈骨质疏松症中的应用前景。

1 骨质疏松症相关研究现状

骨质疏松症是一种退行性病变,常伴有疼痛、疲劳、四肢麻木等功能性兼症,其发病率正在随着人口的老齡化逐年攀升,给患者、家庭和社会带来了沉重负担^[7]。但由于病因多而复杂,具体的发病机制尚不明确。目前比较公认的是,骨质疏松症同时受遗传、衰老、激素、营养状况等众多因素共同影响,引起骨改建过程中成骨细胞和破骨细胞的功能失衡或骨髓间充质干细胞过多地向脂肪细胞分化^[8,9],最终表现为骨质疏松症状。在治疗方面,虽也先后出现多种疗法,但仅局部改善了骨组织钙盐丢失,骨小梁吸收、变细、孔隙增多,骨骼机械力学性能降低等相关症状^[10],长期疗效并不令人满意。另外还受到治疗周期长、药物不良反应较大、易耐受等问题。因此寻找一种治疗骨质疏松的有效方法势在必行。

2 iPS 细胞的研究进展

2006 年,日本 Takahashi 研究小组用逆转录病毒载体将 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc 导入小鼠成纤维细胞^[11],首次将体细胞重编程为具有 ESCs 特性的 iPS 细胞。该技术巧妙地绕开了 ESCs 中的伦理问题,迅速成为干细胞和再生医学领域的研究热点,并不断取得了大量突破性进展,目前的 iPS 细胞技术已经相当成熟。最新研究称,mRNAs^[12]、人造染色体载体(HACs)^[13]等非整合型载体已逐渐取代了逆转录病毒等整合型载体,而“二次编程”^[14]、“直接重编程”^[15]、创造生理性缺氧环境^[16]、阻断 P53^[17]、抑制染色质重塑、抑制细胞衰老^[18]、提纯细胞^[16]等技术也被证实能不同程度的提高重编程效率和安全性。目前,该技术已成功用于帕金森病、糖尿病、某些癌症、脊髓损伤等多基因疾病当中,但迄今为止还没有 iPS 细胞应用于骨质疏松领域的研究报道。

3 建立骨质疏松症的 iPS 细胞模型的可行性与必要性

3.1 建立骨质疏松症的 iPS 细胞模型的依据与基础

骨质疏松症是一种退行性病症,传统的动物模型不能准确、真实反映患者的遗传缺陷和机体紊乱,这极大限制了 OP 的研究与发展。新兴的 iPS 细胞是一种疾病特异性干细胞,携带有患者特异的遗传信息,具有和患者相同的遗传背景,还能体外重现人类疾病从发生、发展到转归的全过程,为疾病研究提

供了非常理想的平台。目前,该技术已广泛用于人类疾病的研究。例如,在心血管疾病领域,研究者利用 LEOPARD 综合征患者的体细胞诱导出了 iPS 细胞,而且 iPS 细胞定向分化出的心肌细胞成功表达出与患者自体心肌细胞相同的病理特征^[4];Itzhaki 等^[19]利用长 QT 间期综合征患者的心肌细胞诱导出动作电位延长特征的心肌细胞,体外模拟了患者体内的病理变化。如果将该技术应用于骨质疏松,将实现从细胞、分子水平对 OP 进行动态研究,全程观察记录 OP 的发生、发展和转归,有助于发现并揭示该病症的本质,最终实现治愈与“个性化治疗”。

3.2 建立骨质疏松的 iPS 细胞模型的必要性

iPS 细胞不仅在细胞形态、基因表达、蛋白翻译、表观遗传学修饰、细胞增殖分化、类胚体和畸胎瘤形成等方面与 ESCs 极为相似,而且易于获取。由于不需要摧毁早期胚胎,所以不存在传统干细胞研究带来的伦理问题。更关键的是 iPS 细胞可塑性极强,如果导入特定的外源基因或针对性地进行基因敲除或改造,可以获得特异的骨细胞,为疾病研究提供基础。藉此我们可以构建骨质疏松的 iPS 细胞模型,在此平台上从分子、细胞甚至组织器官水平对 OP 进行多层面研究。随着人口老齡化,骨质疏松症及其引起的骨折越来越普遍,现已成为继心血管疾病、肿瘤等疾病之后威胁人类生命健康的又一大社会公共健康问题。但其基础理论与临床治疗现状却长期处于缓慢进展甚至停滞状态。鉴于 iPS 细胞技术在神经、心血管等疾病中的成功应用,我们提出利用 iPS 细胞构建骨质疏松症模型的新思路。该模型构建时间短,而传统的骨质疏松症动物模型的建立往往需要几年甚至更长时间,极大限制了相关研究的效率与速率。而建立骨质疏松症的 iPS 细胞模型在一年内就可以构建成功,这不仅大大缩短了建模时间,而且实验表明这些 iPS 细胞在定向诱导培养后,短短几周时间就可模拟出与患者骨组织类似的骨密度降低、骨组织微结构破坏和骨骼脆性增加表现。将 iPS 细胞这一“平皿里的疾病模型”^[20]应用于 OP 研究有助于对骨质疏松症早发现、早诊断、早治疗。

4 iPS 细胞模型在骨质疏松中的应用前景

4.1 已成功建立的 iPS 细胞疾病模型

迄今为止,iPS 细胞已成功用于大量人类疾病的研究。例如,Nelson^[21]将 iPS 细胞分化出的心肌细胞植入心肌梗死小鼠体内恢复了左心室的收缩功

能,抑制了心室壁增厚和心室重构。Tateishi 等^[6]用 iPS 细胞培养出的有分泌 C 肽和胰高血糖素功能的胰岛 β 细胞,缓解了糖尿病小鼠的症状。Kristen 利用精神分裂症(SCZD)患者 hiPS 细胞分化出的功能神经元明显改善了其精神状态^[22]。Mason 用散发性阿尔茨海默病(sAD)患者的 iPS 细胞成功分化出具有 sAD 表型的功能性神经元^[3]等等。该技术定向分化出大量疾病特异的缺陷细胞,体外重演疾病过程,为我们提供了理想的研究模型,也帮助人们解决了许多以往不能解答的难题。

4.2 建立骨质疏松的 iPS 细胞模型的应用前景

帕金森病^[5]、阿尔茨海默症^[3]、精神分裂症^[22]、脊髓损伤^[2]等遗传性疾病的 iPS 细胞模型均已成功建立,近年来又有报道称 Nakao^[23]用 iPS 细胞评估了新型药物 Azumamaides 的抗血管生成活性, Lee^[24]用家族性植物神经功能障碍(FD)患者的 iPS 细胞分化出的疾病相关细胞检测了候选药物激动素 Kinetin 的疗效。目前,iPS 细胞 C 技术现已广泛用于免疫系统、肌肉、血液、胰腺、皮肤、骨髓、肝、肾、视网膜、早衰等众多领域^[25]。虽然还没有关于建立骨质疏松的 iPS 细胞模型报道,但鉴于以上事实,该技术一定也会在骨质疏松症研究中取得成功。除了 iPS 细胞绕开了体外核移植、细胞融合的技术限制及胚胎干细胞的伦理、来源问题,该技术还具有以下优势:第一,骨质疏松患者来源的 iPS 细胞能分化出疾病相关的骨细胞,体外重演骨改建失衡、骨量低、骨组织微结构破坏和骨骼脆性增加等病理变化,为研究 OP 提供高仿真模型。这个新平台将使全程监测 OP 的发生、发展和转归,并从细胞、分子水平进行动态研究成为可能。第二,iPS 细胞 C 技术绕开了胚胎干细胞带来的伦理问题,并且可定向生成匹配每位患者的特异性细胞,因而不存在免疫排斥反应。修复了缺陷基因的 iPS 细胞,可以分化出健康的功能性骨细胞,是细胞移植治疗 OP 的理想来源。第三,与传统的动物模型不同,由 OP 患者的体细胞重编程获得的 iPS 细胞携带有患者的全套遗传信息,能体外真实模拟人类疾病,如实反应药物在患者体内吸收、分布、代谢等特异性变化,有助于筛选出最适合患者的药物,以提高药效、降低毒副作用、实现个体化治疗^[26]。第四,iPS 细胞作为细胞分化源,可以源源不断地生成大量 OP 患者特异的细胞,进行大规模、高通量检测,能够提高实验结果的说服力、可靠性和安全性。总之,建立 OP 的 iPS 细胞模型将极大推动该领域的发展,有望揭露 OP 的确切

病因与致病机制,真正实现完全治愈,彻底改善患者的生活质量。

5 小结与展望

至今,iPS 细胞技术已先后被应用于再生医学、临床医疗、组织工程和药物评估等众多方面。虽然还存在疾病复发和形成畸胎瘤的风险,但随着 iPS 细胞技术研究的不断深入,其操作技术日臻完善,已经能够支持建立多种遗传性疾病的 iPS 细胞模型,而且重编程效率 and 安全性也得到了极大提高,建立骨质疏松症的 iPS 细胞模型将是该领域研究的趋势。另外,iPS 细胞具备体外高度增殖、表型不成熟细胞的可塑性、增殖与分化的可控性等特征,体外建立的 OP 患者特异的 iPS 细胞模型将在药物筛选、毒性检测、致病机制研究和细胞移植治疗等应用中取得突破。不久的将来,iPS 细胞模型一定会给骨质疏松症的基础研究与临床治疗带来重大变革,给广大患者带来福音。

【 参 考 文 献 】

[1] Salari SP, Abdollahi M, Larijani B. Current, new and future treatments of osteoporosis. *Rheumatol Int*, 2011, 31(3): 289-300.

[2] Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al. Human induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(1): 6825-6830.

[3] Israel MA, Yuan SH, Bardy C, et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2012, 482(3): 216-220.

[4] Carvajal VX, Sevilla A, D' Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, 2010, 465(7299): 808-812.

[5] Kriks S, Shim JW, Piao J, et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 2011, 480(1): 547-551.

[6] Maehr R, Chen S, Snitow M, et al. Generation of pluripotent stem cells from patients, with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(37): 15768-15773.

[7] 李宁, 贺良, 龚晓峰, 等. 老年髋部骨折住院患者治疗现状的初步分析. *中华医学杂志*, 2012, 92(35): 2452-2455.

Li N, He L, Gong XF, et al. Preliminary analysis of management for hospitalized elders with hip fracture. *National Medical Journal of China*, 2012, 92(35): 2452-2455.

[8] Stapleton CJ, Pham MH, Attenello FJ, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament: genetics and pathophysiology. *Neurosurg Focus*, 2011, 30(1): 21-28.

- Res, 2006, 21(9):1003-1011.
- [20] Sakamoto W, Isomura H, Fujie K, et al. Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3 T3E1 preosteoblastic cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1740(1): 12-16.
- [21] Herrmann M, Peter SJ, Umanskaya N, et al. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B(6) and B(12) deficiencies in osteoporosis: a systematic review. *Clin Chem Lab Med* [J], 2007, 45(12):1621-1632.
- [22] Graham SM, Howgate D, Anderson W, et al. Risk of osteoporosis and fracture incidence in patients on antipsychotic medication [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2011, 10(4):575-602.
- [23] Samaniego EA, Sheth RD. Bone consequences of epilepsy and antiepileptic medication. *Semin Pediatr Neurol* [J], 2007, 14(4):196-200.
- [24] Sato Y, Kondo I, Ishida S, et al. Decreased bone mass and increased bone turnover with valproate therapy in adults with epilepsy [J]. *Neurology*, 2001, 57(3):445-449.
- [25] Babayit A, Dirik E, Bober E, et al. Adverse effects of antiepileptic drugs on bone mineral density [J]. *Pediatr Neurol*, 2006, 35(2):177-181.
- [26] Mintzer S, Skidmore CT, Rankin SJ, et al. Conversion from enzyme-inducing antiepileptic drugs to topiramate: Effects on lipids and c-reactive protein [J]. *Epilepsy Res*, 2012, 98(1): 88.

(收稿日期:2014-08-06,修回日期:2014-09-23)

(上接第 728 页)

- [9] Li You, Ling Pan, Lin Chen, et al. Suppression of zinc finger protein 467 alleviates osteoporosis through promoting differentiation of adipose derived stem cells to osteoblasts. *Journal of Translational Medicine*, 2012, 10(2): 1186-1199.
- [10] 刘文贵, 何仕诚, 邓钢, 等. 骨质疏松性骨折椎体成形术后的疗效影响因素. *中华医学杂志*, 2011, 91(39): 2772-2775.
- Liu WG, He SC, Deng G, et al. Influencing factors of long-term efficacy following percutaneous vertebroplasty in patients with osteoporosis. *National Medical Journal of China*, 2011, 91(39): 2772-2775.
- [11] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [12] Tavernier G, Wolfrum K, Demeester J, et al. Activation of pluripotency-associated genes in mouse embryonic fibroblasts by non-viral transfection with in vitro-derived mRNAs encoding Oct-4, Sox-2, Klf-4 and c-Myc. *Biomaterials*, 2012, 33(2): 412-417.
- [13] Hiratsuka M, Uno N, Ueda K, et al. Integration-Free iPS Cells Engineered Using Human Artificial Chromosome Vectors. *PLoS ONE*, 2011, 6, e25961.
- [14] Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, et al. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 12(3): 340-345.
- [15] Tapia N, Han DW, Schöler HR. Restoring Stem Cell Function in Aged Tissues by Direct Reprogramming? *Cell Stem Cell*, 2012, 10(2): 653-656.
- [16] Shimada H, Hashimoto Y, Nakada A, et al. Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 659-664.
- [17] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 2009, 460(27): 1132-1135.
- [18] Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, 2011, 8(5):409-413.
- [19] Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modeling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471(2): 225-232.
- [20] Jang J, Yoo J, Lee J, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Experimental and Molecular Medicine*, 2012, 3(2): 202-213.
- [21] Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: A source of cardiac regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011, 50(3): 327-332.
- [22] Kristen J, Simone Anthony, Jou J, et al. Modeling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 47(1): 221-228.
- [23] Maury Y, Gauthier M, Peschanski M, et al. Human pluripotent stem cells for disease modeling and drug screening. *Bio-essays*, 2011, 34(3):61-71.
- [24] Trounson A, Kelly A, Natalie D, et al. Human disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2012, 22(5): 11-18.
- [25] Priori SG, Napolitano C, Di Pasquale E, et al. Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in studies of inherited arrhythmias. *J Clin Invest*, 2013, 123(1):84-91.
- [26] Khan JM, Lyon AR, Harding SE, The case for induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in pharmacological screening. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(2):304-317.

(收稿日期:2013-10-24,修回日期:2014-01-12)