

· 综述 ·

多能干细胞向甲状腺滤泡细胞的诱导分化

林玲 林真 徐一娇 滕菁

【摘要】 多能干细胞(PSCs)是一种特殊的干细胞群,具有自我更新、无限增殖和向3个胚层多向分化的潜能。PSCs包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞,为疾病模型的构建、细胞替代性治疗和药物研发等方面,提供了无限的细胞来源。近期,PSCs通过3-D培养形成甲状腺类器官的研究已成为热点,这项技术基于PSCs向甲状腺滤泡细胞的诱导分化。

【关键词】 多能干细胞;诱导;分化;甲状腺滤泡细胞

Inducing differentiation of pluripotent stem cells into thyroid follicular cells Lin Ling*, Lin Zhen, Xu

Yijiao, Teng Jing. * Medical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen 361000, China

Corresponding author: Teng Jing, Email:tengjing1108@126.com

【Abstract】 Pluripotent stem cells (PSCs) are a special group of stem cells characterized by their capability to self-renew, infinite proliferation and the potential to differentiate into all derivative cell types of the three germ layers. PSCs, including embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, provide a unlimited cell source to build disease modeling, study cell-replacement therapy and facilitate drug discovery. Recently, thyroid organoids, generated from PSCs through the development of three-dimensional culture systems, have become a hot topic. This technology builds upon a foundation of inducing PSCs.

【Key words】 Pluripotent stem cells; Induce; Differentiation; Thyroid follicular cells

类器官来源于多能干细胞(PSCs)或器官前体祖细胞,分化及自我组织成类似器官的结构,包含至少一种器官特有的细胞类型,能够体现器官某些特定的功能^[1]。近年来,类器官培养技术在组织器官发生、发展、药物疗效和毒理学检测、疾病模型构建以及再生医学方面具有很高的应用价值,尤其在甲状腺研究领域,甲状腺类器官的研究备受关注。早期研究表明,分离的鸡胚甲状腺细胞和成年大鼠甲状腺分离的细胞能够重新聚集形成功能性的甲状腺组织,揭示甲状腺组织可能具有自我组织的特性^[2-3]。这项突出的特性表明甲状腺类器官或许可以来源于PSCs产生的器官前体,而该技术的核心是PSCs诱导分化为功能性的甲状腺滤泡细胞(TFCs)。近10年来,ESCs诱导分化为TFCs的研究较为广泛,而最近诱导多能干细胞(iPSCs)向TFCs诱导分化日益成为研究的热点,特别是患者来

源的iPSCs有望成为未来疾病建模的一个有价值的工具。现对体外PSCs诱导分化为TFCs的研究进展予以综述。

1 胚胎干细胞(ESCs)向TFCs诱导分化

ESCs从囊胚的内细胞团中分离,可以在未分化状态下无限繁殖。当ESCs在体外诱导分化时,形成三维结构,称为拟胚体。拟胚体贴壁后或嵌入基质胶中培养可以进一步促进其分化。随着许多新的合适的培养条件的研发,ESCs在体外可分化成为广泛的细胞类型^[4]。

1.1 诱导ESCs“定向分化”为TFCs“定向分化”是将未分化的ESCs连续暴露在含一系列生长因子的培养基中,而不需要过度表达外源基因,这种方法已被成功用于诱导产生多种来自ESCs的非甲状腺细胞系^[5]。然而,甲状腺定向分化所需分子和信号通路尚未完全明确,诱导ESCs“定向分化”为TFCs发展缓慢。

2003年,Lin等^[6]首次展示了体外小鼠ESCs可分化为TFCs。来源于小鼠的ESCs表达干细胞标志物,而不表达甲状腺特异性的标志物。培养6d后有血清培养组的拟胚体表达钠/碘同向转运体

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2018.06.009

作者单位:361000 厦门市中医院检验科(林玲、林真、滕菁);210028 南京中医药大学附属中西医结合医院内分泌代谢病院区(徐一娇)

通信作者:滕菁,Email:tengjing1108@126.com

(NIS)、Pax8、甲状腺球蛋白(Tg)、甲状腺过氧化物酶(TPO)和促甲状腺激素受体(TSHR)基因。无血清培养组添加促甲状腺激素(TSH)能促进Pax8和TSHR基因的表达,但是缺乏Tg的表达。Arufe等^[7]将绿色荧光蛋白(GFP)cDNA靶向连接到TSHR基因上,发现在无血清的培养基中TSH能刺激拟胚体表达TSHR。在胰岛素和胰岛素样生长因子-1的作用及基质胶的支撑下,这些甲状腺祖细胞转化为细胞聚集物,GFP阳性的ESCs形成了甲状腺滤泡样簇^[8]。Kubo等^[9]研究发现,在小鼠和人类ESCs的培养基中添加激活素A能够促进ESCs向限定性内胚层诱导分化。激活素A是由性腺分泌的大分子糖蛋白,是转化生长因子-β(TGF-β)家族中的一员。Ma等^[10]的研究也表明,激活素A具有诱导ESCs分化为甲状腺内胚层的作用。

此外,Green等^[11]通过由WNT3a、角质细胞生长因子(KGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)10、骨形态发生蛋白4(BMP4)和表皮生长因子(EGF)组成的生长因子混合物进一步引导ESCs进入腹侧前肠内胚层。Longmire等^[12]发现,在上述生长因子混合物中加入FGF2能有效诱导ESCs中Nkx2-1⁺细胞表达甲状腺上皮特异性基因如Tg。然而,这些细胞并没有分化为完全成熟的甲状腺,因为碘代谢和甲状腺激素生物合成所需要的基因如NIS和TPO并没有显著表达。Kurmann等^[5]研究表明,BMP4和FGF2的刺激对小鼠和人PSCs来源的内胚层前体定向分化为转录因子Nkx2-1⁺的甲状腺细胞是必不可少的,联合使用TSH和三维培养可促进甲状腺滤泡的成熟和类器官的形成,移植后能够在体内分泌甲状腺激素,促进甲状腺功能减退症小鼠症状的恢复。

以上研究表明,ESCs“定向分化”为TFCs是一种可行的方法,TFCs移植到缺乏甲状腺或甲状腺功能减退症小鼠体内,可促进其症状的恢复,表明生成了功能性的甲状腺组织。

1.2 转录因子Nkx2-1和Pax8诱导ESCs分化为TFCs

最近两项研究表明,转录因子Nkx2-1和Pax8的过表达能使ESCs直接分化为TFCs,随后在TSH作用下形成三维的滤泡结构,不需要荧光分选和富集细胞。Antonica等^[13-14]利用悬滴法培养ESCs,使之形成拟胚体,将拟胚体嵌入三维基质胶中,通过doxycyclin-TetOn系统诱导Nkx2-1和Pax8的共表达,再添加人重组TSH刺激甲状腺滤泡的形成。分化的细胞表现出甲状腺的特征如甲状腺标志物的表达

和固有的碘代谢能力,更重要的是将其移植到缺乏甲状腺的小鼠体内,可以提高血浆甲状腺激素水平,继而促进其症状的恢复,表明ESCs分化形成的三维甲状腺滤泡是有功能的。Ma等^[15]在转染后稳定过表达Pax8和Nkx2-1的ESCs培养基中添加激活素A培养5d形成拟胚体,再于含TSH的基质胶中培养16d,qRT-PCR检测结果显示4种甲状腺特异性基因(NIS、TSHR、Tg和TPO)表达增加,此外通过免疫荧光技术发现基底表面存在NIS的表达,细胞内存在Tg,表明形成了三维甲状腺滤泡。

2015年,Ma等^[16]将同样的技术应用于人ESCs(line H9),通过高效的慢病毒载体转导使细胞稳定表达Pax8和Nkx2-1,联合使用激活素A诱导Sox17和Foxa2的表达,促进其内胚层表型的发育,而加入TSH能够诱导Pax8⁺Nkx2-1⁺细胞Tg的表达,故这些细胞不仅能够形成三维的滤泡结构,而且还能在其基底外侧表面表达TSHR和NIS,以及在滤泡腔内表达Tg。该研究表明,人ESCs可以通过与小鼠ESCs相似的转录方式分化为有功能的甲状腺组织。

上述研究结果表明,Nkx2-1和Pax8的过表达和激活素A、TSH的联合使用促进ESCs分化为三维的成熟甲状腺滤泡,将其移植到缺乏甲状腺的小鼠体内,能促进小鼠相应功能的恢复,提示生成了功能性的TFCs。

2017年,Ma等^[17]发现使用转录共激活因子与PDZ结合接口(TAZ)的激活剂依沙吖啶,能够促进人ESCs分化为功能性甲状腺细胞,实验观察到甲状腺滤泡形成、丰富的Tg蛋白表达、TSH诱导和剂量依赖性放射性碘摄取及蛋白结合碘的积累。TAZ是一种共激活因子,能够调节Nkx2-1和Pax8在内的多种转录因子,在甲状腺特异性基因表达中起重要作用。该研究没有使用任何基因转染或复杂的培养条件,通过直接操纵转录机制而不干扰中间信号事件,一定程度上避免了移植物在体内形成肿瘤的风险,也再次证明了转录调控在甲状腺细胞发育中的重要性。

2 iPSCs向TFCs诱导分化

2006年,Takahashi和Yamanaka^[18]用反转录病毒载体使小鼠成纤维细胞表达Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc等4个转录因子,成功获得具有多向分化潜能的干细胞,并将其命名为iPSCs,开辟了从体细胞诱导形成PSCs的新途径。iPSCs具有类似于ESCs的特征,又避免了伦理和免疫排斥等问题。随着重

新编程技术的进步,患者源性 iPSCs 的产生在数量和质量上克服了细胞来源的问题。

2015 年, Ma 等^[19] 使用慢病毒使小鼠胚胎成纤维细胞重新编程生成小鼠 iPSCs, 其能表达 ESCs 标志基因(Oct4、Klf4、c-Myc、Sox2)。然后转染 Pax8 和 Nkx2-1, 并在激活素 A 和 TSH 刺激下诱导 iPSCs 形成内胚层胚体, 最终分化为甲状腺滤泡。甲状腺特异性基因(NIS、TSHR、Tg 和 TPO)的表达显著增强, 在 TSH 的刺激下, 这些分化的 iPSCs 具有摄碘和剂量依赖的 cAMP 生成能力。此外, 细胞在培养过程中形成三维的滤泡结构, 将 Pax8⁺ Nkx2-1⁺ 的 iPSCs 移植到裸鼠后形成“甲状腺类器官”, 并表达 Tg 蛋白。该实验表明, 来源于小鼠成纤维细胞的 iPSCs 能够分化为功能性的 TFCs, 与 ESCs 发育而来的甲状腺细胞具有非常相似的性质。Arauchi 等^[20] 成功地将人来源的 iPSCs 在可伸缩悬浮培养系统中诱导产生功能性 TFCs。与 ESCs 诱导分化为 TFCs 的方法相似, 通过激活素 A 处理后 iPSCs 可表达 Sox17 和 Foxa2, 促进其内胚层表型的发育, 也表达了甲状腺转录因子 Pax8 和 Nkx2-1。进一步使用 TSH 处理可诱导其表达多种甲状腺特异性标志物, 包括 TSHR、NIS、Tg 和 TPO。此外, 分化的细胞在体外能够分泌游离甲状腺素。

Kurmann 等^[5] 将诊断为脑-肺-甲状腺综合征的 3 例甲状腺功能减退症儿童(3 种不同的 Nkx2-1 编码序列突变引起)的真皮成纤维细胞, 使用单一慢病毒“干细胞盒”(STEMCCA) 转染, 使其重编程生成相应的 iPSCs。STEMCCA 是一个多顺反子载体, 能够同时编码 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 个转录因子, iPSCs 进一步分化产生了具有遗传或先天性甲状腺功能减退症患者特异性甲状腺祖细胞^[11]。

以上的实验指出 iPSCs 向 TFCs 分化具有与 ESCs 相似的特征, 且可以通过使用患者来源的 iPSCs 或者使用现代基因编程技术将患者基因突变引入人的 PSCs 来建造疾病模型。从细胞水平研究疾病的发病机制以及个体对药物的反应, 可使个体化药物治疗成为现实。因此, 患者的 iPSCs 有望成为疾病建模的一个有价值的工具^[21]。

3 结论与展望

甲状腺是人体最大的内分泌腺, 由多种不同类型的细胞构成, 它们来自于 3 个胚胎干细胞层。其中甲状腺滤泡细胞是最丰富的细胞群, 构成了腺体的大部分, 其由前肠内的一小部分内胚层细胞发育

而来, 主要的功能是合成甲状腺激素并代谢碘, 这些激素是几乎所有组织生长、发育和代谢关键的调节器^[20]。

在胚胎发生过程中, 前肠内胚层的前后轴被放置在包括原始甲状腺、肺、胰腺和肝脏在内的器官特定区域, 一组注定要成为 TFCs 的细胞在原始的咽中被发现, 共同表达 Nkx2-1、Foxe、Pax8 和 Hhex 而被分离, 这些基因在甲状腺外的其他组织中都有表达, 但是它们的共同表达仅局限于甲状腺, 它们相互作用促进甲状腺器官的发生^[22-23]。Nkx2-1 和 Pax8 在甲状腺细胞分化和甲状腺基因转录方面发挥重要作用, 可直接调控 Tg、TPO、TSHR 和 NIS 等甲状腺特异性基因的表达^[24-25]。对上述甲状腺转录因子的研究, 极大地促进了对甲状腺发育、先天性甲状腺疾病和甲状腺癌的认识^[24]。

理论上, ESCs 可以分化成各种组织的细胞, 但是存在以下问题:(1) ESCs 供体的来源涉及伦理和免疫排斥等问题, 使未来的研究受到限制。(2) ESCs 定向诱导分化成甲状腺细胞, 在分子水平上的诱导机制不完全清楚。(3) 需要精密的调控, 控制 ESCs 处于未分化的增殖状态, 通过特定的途径引导这些细胞的发育^[26]。与 ESCs 不同的是, iPSCs 容易获得、无争议, 能够从患者的细胞中产生, 因此可以作为干细胞向 TFCs 分化研究中的一种全新的种子细胞。基于 ESCs 在挽救缺乏甲状腺小鼠方面的成功, iPSCs 衍生的甲状腺滤泡作为多种甲状腺疾病的细胞替代疗法具有巨大的潜能。患者来源的 iPSCs 具有不同的甲状腺疾病的基因型, 可以用于研究疾病的发病机制, 也可以提供筛选系统来评估药物和重组方法以治疗这些疾病, iPSCs 衍生的甲状腺滤泡更容易量化药物对滤泡结构和功能的影响。虽然对 iPSCs 的研究从最初发现以来已经取得了很大的进展, 但是 iPSCs 重新编程步骤的效率和安全性问题也不容忽视^[26-27]。综上所述, iPSCs 与 ESCs 相似, 可以诱导分化为功能性的 TFCs, 在细胞替代疗法、疾病模型构建和药物研发方面潜力无限。

参 考 文 献

- [1] Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies [J]. Science, 2014, 345 (6194): 1247125. DOI: 10.1126/science.1247125.

- [2] Mallette JM, Anthony A. Growth in culture of trypsin dissociated thyroid cells from adult rats [J]. *Exp Cell Res*, 1966, 41 (3) : 642-651.
- [3] Hilfer SR, Iszard LB, Hilfer EK. Follicle formation in the embryonic chick thyroid. II. Reorganization after dissociation [J]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1968, 92 (2) : 256-269.
- [4] Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development [J]. *Cell*, 2008, 132 (4) : 661-680. DOI: 10.1016/j.cell.2008.02.008.
- [5] Kurmann AA, Serra M, Hawkins F, et al. Regeneration of thyroid function by transplantation of differentiated pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17 (5) : 527-542. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.004.
- [6] Lin RY, Kubo A, Keller GM, et al. Committing embryonic stem cells to differentiate into thyrocyte-like cells *in vitro* [J]. *Endocrinology*, 2003, 144 (6) : 2644-2649. DOI: 10.1210/en.2002-0122.
- [7] Arufe MC, Lu M, Kubo A, et al. Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into thyroid follicular cells [J]. *Endocrinology*, 2006, 147 (6) : 3007-3015. DOI: 10.1210/en.2005-1239.
- [8] Arufe MC, Lu M, Lin RY. Differentiation of murine embryonic stem cells to thyrocytes requires insulin and insulin-like growth factor-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381 (2) : 264-270. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.02.035.
- [9] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, et al. Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture [J]. *Development*, 2004, 131 (7) : 1651-1662. DOI: 10.1242/dev.01044.
- [10] Ma R, Latif R, Davies TF. Thyrotropin-independent induction of thyroid endoderm from embryonic stem cells by activin A [J]. *Endocrinology*, 2009, 150 (4) : 1970-1975. DOI: 10.1210/en.2008-1374.
- [11] Green MD, Chen A, Nostro MC, et al. Generation of anterior foregut endoderm from human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (3) : 267-272. DOI: 10.1038/nbt.1788.
- [12] Longmire TA, Ikonomou L, Hawkins F, et al. Efficient derivation of purified lung and thyroid progenitors from embryonic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10 (4) : 398-411. DOI: 10.1016/j.stem.2012.01.019.
- [13] Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells [J]. *Nature*, 2012, 491 (7422) : 66-71. DOI: 10.1038/nature11525.
- [14] Antonica F, Kasprzyk DF, Schiavo AA, et al. Generation of functional thyroid tissue using 3D-based culture of embryonic stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1597 : 85-95. DOI: 10.1007/978-1-4939-6949-4_7.
- [15] Ma R, Latif R, Davies TF. Thyroid follicle formation and thyroglobulin expression in multipotent endodermal stem cells [J]. *Thyroid*, 2013, 23 (4) : 385-391. DOI: 10.1089/thy.2012.0644.
- [16] Ma R, Latif R, Davies TF. Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles [J]. *Thyroid*, 2015, 25 (4) : 455-461. DOI: 10.1089/thy.2014.0537.
- [17] Ma R, Morshed SA, Latif R, et al. TAZ induction directs differentiation of thyroid follicular cells from human embryonic stem cells [J]. *Thyroid*, 2017, 27 (2) : 292-299. DOI: 10.1089/thy.2016.0264.
- [18] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [19] Ma R, Morshed SA, Latif R, et al. Thyroid cell differentiation from murine induced pluripotent stem cells [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6 : 56. DOI: 10.3389/fendo.2015.00056.
- [20] Arauchi A, Matsuura K, Shimizu T, et al. Functional thyroid follicular cells differentiation from human-induced pluripotent stem cells in suspension culture [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8 : 103. DOI: 10.3389/fendo.2017.00103.
- [21] Gingold J, Zhou R, Lemischka IR, et al. Modeling cancer with pluripotent stem cells [J]. *Trends Cancer*, 2016, 2 (9) : 485-494. DOI: 10.1016/j.trecan.2016.07.007.
- [22] De Felice M, Di Lauro R. Minireview: intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update [J]. *Endocrinology*, 2011, 152 (8) : 2948-2956. DOI: 10.1210/en.2011-0204.
- [23] Fagman H, Nilsson M. Morphogenetics of early thyroid development [J]. *J Mol Endocrinol*, 2011, 146 (1) : R33-R42.
- [24] Fernández LP, López-Márquez A, Santisteban P. Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11 (1) : 29-42. DOI: 10.1038/nrendo.2014.186.
- [25] Dame K, Cincotta S, Lang AH, et al. Thyroid progenitors are robustly derived from embryonic stem cells through transient, developmental stage-specific overexpression of Nkx2-1 [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8 (2) : 216-225. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.12.024.
- [26] Sewell W, Lin RY. Generation of thyroid follicular cells from pluripotent stem cells: potential for regenerative medicine [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014, 5 : 96. DOI: 10.3389/fendo.2014.00096.
- [27] Okano H, Nakamura M, Yoshida K, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells [J]. *Circ Res*, 2013, 112 (3) : 523-533. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.256149.

(收稿日期:2018-04-21)