

本文引用格式:何雨晨,蔡多特,张书豪,等.先天性巨结肠细胞治疗研究进展[J].安徽医学,2023,44(10):

1156-1159.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.002

·先天性巨结肠诊疗·

先天性巨结肠细胞治疗研究进展

何雨晨 蔡多特 张书豪 金益 高志刚 邵敏

[摘要] 先天性巨结肠(HD)是远端肠道无肠道神经定植导致的先天性结构畸形。目前HD的公认治疗方式是利用外科手术切除无神经节细胞的肠段,但即使近年来术式不断改良,患者仍会出现术后顽固性便秘和小肠结肠炎等常见手术并发症,同时不可避免的手术相关创伤和时有发生的手术副损伤给患者带来严重的不良预后。细胞治疗作为新兴的非手术治疗策略,通过细胞增殖、移植以及分化的方式来修复HD患者缺乏的肠道神经,可以避免外科手术导致的并发症,有较高的临床研究价值,是一种值得期待的HD治疗新思路。本文对目前HD细胞治疗的研究进展进行综述,重点论述细胞来源和潜在的问题和挑战,并对其未来发展提出展望和期待。

[关键词] 先天性巨结肠;细胞治疗;干细胞;肠神经系统

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.002

先天性巨结肠(Hirschsprung disease, HD)是一种肠神经系统发育障碍导致的先天性结构畸形,是造成新生儿和婴幼儿肠梗阻的主要原因,在全球新生儿的发病率约为1/5 000~1/3 500,亚洲人群发病率最高^[1]。HD是胚胎发育阶段远端肠道缺少神经细胞定植导致^[2],依据无神经节细胞肠段的长度可分为短段型、长段型和全结肠型^[3]。目前,公认的HD治疗方式仍是外科手术,通过外科手术可将无神经节细胞的肠段切除,并将正常肠段与肛管吻合。常用的根治手术术式有Swenson、Duhamel、Soave和Rehbein等^[4]。近十年来,随着微创技术的推广,传统根治手术得到了改良,腹腔镜辅助技术使HD根治术的解剖精度有了极大的飞跃,术后顽固性便秘和小肠结肠炎等并发症发生率在一定程度上改善,但仍不能彻底消除,而且大便失禁、泌尿系统损伤等手术导致的副损伤仍时有发生,一旦发生则严重影响HD患者的术后生活质量^[5]。非手术方式治疗HD是一种减少手术创伤、避免手术副损伤的前沿医学研究,也是临床医师追寻期许的治疗新策略,细胞治疗就是其中一种,其潜在优势在于不仅可以有效规避外科手术相关的不良预后,还能最大程度地重建肠道神经结构以及恢复肠道功能,现已成为HD新治疗策略的研究热点^[6]。本文拟从细胞来源、问题与挑战、总结与展望3方面对HD细胞治疗的研究进展进行综述。

1 细胞来源

再生医学的快速发展为HD的治疗带来了一种基于细胞层面的新策略,目前可用于HD治疗的细胞类型有多能干细胞(pluripotent stem cells, PSC)、肠神经嵴来源细胞(enteric neural crest-derived cells, ENCDC)等。除此之外, Pan等^[7]发现来源于HD患者无神经节细胞肠段表达PLP1的施旺细胞拥有分化潜力,可以将其分化出的神经嵴细胞(enteric neural crest cells, ENCC)移植回HD患者的肠段用于治疗。

1.1 PSC PSC可分为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)和人类胚胎干细胞(human pluripotent stem cells, hPSC), PSC的增殖能力使其在细胞疗法中潜力巨大。相较于其他细胞来源的细胞治疗方法, PSC的一个重要优势在于可以通过基因编辑(例如Crisper/Cas9基因编辑技术)的方式纠正HD相关的基因突变^[8],也为从基因水平研究HD的发病机制提供了便利。早在2007年, Takahashi等^[9]通过4种逆转录因子——Oct3/4、Sox2、Klf4以及c-Myc将成人的体细胞重新编码为多能干细胞,且与hPSC有着相似的形态、基因表达、端粒酶活性等。科学家为了减少HD患者移植后机体的免疫排斥反应,尝试利用hPSC对患者病变肠管进行细胞治疗, Fattahi等^[10]通过抑制hPSC的转化生长因子 β , 将其分化为ENCC并移植到HD小鼠

基金项目:浙江省中医药项目(编号:2021ZA084);浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(编号:2023C03029)

作者单位:310029 浙江杭州 浙江大学医学院(何雨晨)

310052 浙江杭州 浙江大学医学院附属儿童医院普外科(蔡多特,张书豪,金益,高志刚)

310016 浙江杭州 浙江大学医学院附属第二医院体检中心(邵敏)

通信作者:高志刚, ebwk@zju.edu.cn

(Ednrb^{s-1/6-1}),成功降低了小鼠HD相关死亡率。Frith等^[11]则在此基础上发现维A酸可以更快速地通过抑制骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)水平,高效地在体外诱导出ENCC,并可在肠道内定植,优化了PSC细胞来源的细胞治疗策略。虽然PSC分化成ENCC的速度得到了显著提升,但是PSC分化方向的不确定性导致其诱导产生有效ENCC的数量不足,这始终是困扰科学家们的一大难题。Lau等^[12]建立了一种新型的实验算法,可以为hPSC分化成ENCC提供指导,其发现Hedgehog信号通路可以追踪未成熟的ENCC过渡到成熟ENCC以及从ENCC发育成肠神经元的过程,在利用hPSC对HD患者进行细胞治疗时,可以利用这一算法指导ENCC谱系以最大产量向着最适配的功能分化。而在全结肠型危重HD的细胞治疗中,Fan等^[13]通过在HD小鼠(Ednrb KO/NSG,肠道神经节细胞缺乏从结肠延伸到小肠)盲肠内注射hPSC来源的迷走神经嵴细胞(vagal neural crest cells, VNC)和骶骨神经嵴细胞(sacral neural crest cells, SNC)的等比例混合液,显著延长了与单一注射VNC或SNC相比小鼠的存活时间,为全结肠型危重HD患者的细胞治疗方法增添了新思路。

1.2 ENCC 在肠道神经发育过程中,ENCC在肠管中受到遗传和环境因素影响,被多种信号通路调节(如一部分ENCC会表达结肠癌缺失基因(deleted in colorectal cancer, DCC)受体,其介导的轴突导向因子信号通路是ENCC在肠道进行放射状迁移到黏膜下肌层所必需的),从而沿着整个肠道进行增殖、分化并迁移,最终形成肠道神经元和神经胶质细胞^[14]。近几年,已经有研究证实人类机体来源的ENCC移植入小鼠无神经节细胞的肠段,受肠段的微环境影响,移植的ENCC会向无神经节细胞的病变肠段迁移,改善HD小鼠的肠道症状,甚至能达到治愈的效果^[15-17]。但是由于HD肠道炎症和肠道菌群紊乱等原因,ENCC短期定植到HD肠段会发生大规模的凋亡。Tian等^[18]研究发现借助粪便微生物可以增加短链脂肪酸通过MEK1/2信号改善ENCC定植存活率低的问题。除此之外,也有科学家^[19-20]提出调节HD肠段内细胞生态位分子水平及细胞外基质-细胞相互作用,对维持ENCC移植发育的良好微环境,提高ENCC定植成功率有重大意义。国内外科学家对于ENCC的最佳来源也展开了各种研究。Cheng等^[21]研究发现,黏膜下和肌间神经丛的ENCC拥有相似的分化潜能,Wilkinson等^[22]研究团队从HD无神经节细胞的肠段中分离出可以用来细胞治疗的ENCC,且与正常肠段中分离出的ENCC一样具有分化和迁移能力。

目前,在模式动物中植入ENCC的相关研究已经取得较大进展,已经有报道^[23]用野生型小鼠作为移植

供体,成功地将表达ChR2的神经元移植到HD小鼠的无神经节区。显微注射技术是将分化完成的细胞移植到HD模式动物肠管的主要方法,而内窥镜下的显微注射技术会给受体提供一个更安全、有效的细胞移植方式。Cheng等^[24]发现在内窥镜下进行显微注射比直接进行开放性手术更节约时间,且被移植小鼠未出现并发症。Cooper等^[15]则提出移植前的细胞准备程序是影响移植成功与否的重要一环,主要包括了检验移植细胞是否具有正常功能、是否能够安全移植等流程。针对移植ENCC的效率,Zhao等^[25]团队通过Y-27632抑制ROCK信号通路显著加速了ENCC在体内的生长和迁移。

1.3 施旺细胞 有研究表明,除了VNC和SNC,施旺细胞前体也参与了肠道神经系统的形成,而胶质细胞源性神经营养因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)和内皮素3(endothelin 3, EDN3)则是起到了趋化引导肠道神经细胞在肠道内迁移定植的作用^[26]。在肠道神经系统的发育过程被更多地研究背景下,Soret等^[27]发现对HD小鼠(HoTg/Tg, Ednrb^{s-1/s-1}以及雌性TashTg/Tg)进行GDNF灌肠,可以导致全结肠的内源性GDNF和Ret因子表达水平升高,促进神经元细胞的形成,全面改善结肠结构和功能。虽然对GDNF诱导产生神经元细胞的机制了解尚不清楚,但是该研究发现1/3的新生神经元细胞来自外源性Dhh-Cre+施旺细胞。除此之外,研究者还发现以C57BL/6N为遗传背景的HD小鼠(HoTg/Tg)与以FVB/N为遗传背景的HoTg/Tg小鼠相比,在进行GDNF灌肠后会产生更为密集的肠道神经元细胞^[28]。Pan等^[7]则利用细胞培养、活体细胞成像等研究成功完成了对在HD患者无神经节肠段中定植表达PLP1的施旺细胞的分离、扩增,再度证明了用施旺细胞诱导产生肠神经元细胞的可能性,为细胞治疗的细胞来源增添了新的选择。

2 问题与挑战

2.1 治疗效果 近几年的研究发现,HD患者不仅存在远端肠道神经缺失的现象^[29-30],还有Cajal间质细胞的缺乏、内在B淋巴细胞缺陷^[31]、肠道菌群紊乱^[32]等其他肠道改变。而目前HD患者的细胞治疗策略主要针对的是远端肠道无神经定植的问题,细胞治疗能否同时矫治肠道神经缺乏之外的病变具有不确定性,因此细胞治疗是否能完全恢复HD患者的肠道功能便成了亟待回答的问题。虽然Bhave等^[33]通过移植ENCC到HD小鼠缺乏肠道神经的肠段可以显著增加HD小鼠的Cajal间质细胞,解决HD病变肠道Cajal间质细胞缺乏的问题。但是Cajal间质细胞数量的增加能否对HD肠道蠕动功能的恢复提供帮助,相关研究仍然较少。同样,细胞治疗对HD患者的免疫功能、肠道平滑

肌功能等的影响作用也是不确定的。此外,细胞治疗过程中是否可以产生足够的肠道来源细胞,移植后是否可以发生有效的细胞迁移,使移植后的肠道神经细胞稳定定植在 HD 病变肠段等问题,目前都有待进一步探索。

2.2 安全性评估 细胞癌变主要发生在利用 PSC 分化 ENCC 的过程中,由于是通过人工技术化生或维持 PSC 的,这些细胞的生存条件很大程度地偏离了生物体内自然环境,更容易发生染色体畸变、拷贝数变异或单核苷酸变异等突变,这成为其恶变倾向的主要因素^[6,34]。因此,研究者想要从临床试验中得到细胞治疗是否会癌变的安全性评价,长时间的随访必不可少^[6]。这种突变可在分化之前和分化之后发生,而分化之后发生的遗传物质改变更容易被忽略^[35]。除此之外,细胞疗法的致癌性还可能与介导重新编码的因子持续在 PSC 中保持活性有关,这进一步提高了基因突变的概率^[35]。例如,介导体细胞重新编码为 PSC 的逆转录因子 c-Myc,正是最常见的癌变因子之一^[9]。因此,安全性评估和如何有效控制细胞癌变是 HD 细胞治疗亟待解决的关键性课题之一。

2.3 伦理道德 虽然现在大部分细胞疗法的细胞来源都是自体细胞,但是在临床和科研的探索过程中,细胞疗法大多使用的还是同种异体的细胞,这就可能导致伦理道德问题的发生^[36]。此外,采用损伤人类胚胎的代价来换取对某个疾病的缓解,这个伦理问题仍一直困扰着各种细胞治疗方案,这不仅仅是针对 HD,也是导致近十年只有少数细胞疗法能通过监管批准进入市场的原因^[37]。

临床试验之前风险收益比评估也是一项必要的伦理评价指标^[38]。在现有接受根治手术的 HD 患者中,总体优良存活率 $\geq 95\%$ ^[39-40],这就引发了这样一个问题:是否有必要在这些患者中开展首例人类细胞疗法临床试验? Alhawaj 等^[37]对此提出了一个临床试验设想:将存在造瘘高风险的长段型巨结肠患者作为先期试验对象,将细胞治疗作为根治手术的辅助治疗方案,类似于晚期恶性肿瘤的术前化疗方案,这部分患者将有可能在细胞疗法试验中获益,减少肠造瘘概率,改善根治术前的生活质量,同时有望在试验成功时治愈疾病无需手术。

3 总结与展望

虽然 HD 的细胞治疗仍处于起步阶段,各类临床研究和试验还有很长的路要走,但是近十年的研究成果已经可以看到这一领域有着巨大的潜力,有望在未来可以推动临床上 HD 的非手术治疗进展,不仅如此,细胞治疗也在 HD 的致病机制、模型构建^[41]、药物开发^[42]等领域有着不可替代的地位。

与此同时,细胞治疗在进入大众视野之前,还需要经受许多考验和挑战:如何在进行临床试验和研究过

程中不触碰伦理道德底线,如何能够在体外更精确地控制细胞分化,以及如何最大程度减少移植细胞的癌变等都是未来需要解决的难题。

参考文献

- [1] KARIM A, TANG C S, TAM P K. The emerging genetic landscape of hirschsprung disease and its potential clinical applications[J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 638093.
- [2] XIAO J, HAO L W, WANG J, et al. Comprehensive characterization of the genetic landscape of familial Hirschsprung's disease[J]. *World J Pediatr*, 2023, 19(7): 644-651.
- [3] TORROGLOSA A, VILLALBA-BENITO L, FERNANDEZ R M, et al. Identification of new potential lncrna biomarkers in hirschsprung disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5534.
- [4] ALLIN B S R, OPONDO C, BRADNOCK T, et al. Impact of rectal dissection technique on primary-school-age outcomes for a British and Irish cohort of children with Hirschsprung disease[J]. *J Pediatr Surg*, 2022, 57(12): 902-911.
- [5] KLEIN M, VARGA I. Hirschsprung's disease—recent understanding of embryonic aspects, etiopathogenesis and future treatment avenues[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(11): 611.
- [6] NITKIN C R, RAJASINGH J, PISANO C, et al. Stem cell therapy for preventing neonatal diseases in the 21st century: Current understanding and challenges[J]. *Pediatr Res*, 2020, 87(2): 265-276.
- [7] PAN W, RAHMAN A A, STAVELY R, et al. Schwann cells in the aganglionic colon of hirschsprung disease can generate neurons for regenerative therapy[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(12): 1232-1244.
- [8] LAI F P, LAU S T, WONG J K, et al. Correction of Hirschsprung-associated mutations in human induced pluripotent stem cells via clustered regularly interspaced short palindromic repeats/cas9, restores neural crest cell function[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(1): 139-153.
- [9] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [10] FATTAHI F, STEINBECK J A, KRIKS S, et al. Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease[J]. *Nature*, 2016, 531(7592): 105-109.
- [11] FRITH T J R, GOGOLOU A, HACKLAND J O S, et al. Retinoic acid accelerates the specification of enteric neural progenitors from in-vitro-derived neural crest[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15(3): 557-565.
- [12] LAU S T, LI Z, PUI-LING LAI F, et al. Activation of hedgehog signaling promotes development of mouse and human enteric neural crest cells, based on single-cell transcriptome analyses[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(6): 1556-1571.
- [13] FAN Y, HACKLAND J, BAGGIOLINI A, et al. hPSC-derived sacral neural crest enables rescue in a severe model of Hirschsprung's disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(3): 264-282.
- [14] BAKER P A, IBARRA-GARCÍA-PADILLA R, VENKATESH A, et al. In toto imaging of early enteric ner-

- vous system development reveals that gut colonization is tied to proliferation downstream of Ret[J].*Development*,2022, 149 (21): dev200668.
- [15] COOPER J E, NATARAJAN D, MCCANN C J, et al. In vivo transplantation of fetal human gut-derived enteric neural crest cells[J].*Neurogastroenterol Motil*,2017, 29 (1): e12900.
- [16] ROLLO B N, ZHANG D, STAMP L A, et al. Enteric neural cells from hirschsprung disease patients form ganglia in autologous aneuronal colon[J].*Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2 (1): 92-109.
- [17] NAKAZAWA-TANAKA N, FUJIWARA N, MIYAHARA K, et al. Increased enteric neural crest cell differentiation after transplantation into aganglionic mouse gut[J].*Pediatr Surg Int*,2022, 39 (1): 29.
- [18] TIAN D, XU W, PAN W, et al. Fecal microbiota transplantation enhances cell therapy in a rat model of hypoganglionosis by SCFA-induced MEK1/2 signaling pathway[J].*EMBO J*, 2023, 42 (1): e111139.
- [19] JI Y, TAM P K, TANG C S. Roles of enteric neural stem cell niche and enteric nervous system development in hirschsprung disease[J].*Int J Mol Sci*,2021, 22 (18): 9659.
- [20] YASUI Y, YOSHIZAKI H, KUWAHARA T, et al. Transplanted neural crest cells migrate toward Auerbach's plexus layer instead of the colon surface in recipient colon pretreated with collagenase and fibronectin[J].*Biochem Biophys Res Commun*,2022, 601: 116-122.
- [21] CHENG L S, HOTTA R, GRAHAM H K, et al. Postnatal human enteric neuronal progenitors can migrate, differentiate, and proliferate in embryonic and postnatal aganglionic gut environments[J].*Pediatr Res*,2017, 81 (5): 838-846.
- [22] WILKINSON D J, BETHELL G S, SHUKLA R, et al. Isolation of enteric nervous system progenitor cells from the aganglionic gut of patients with Hirschsprung's disease[J].*PLoS One*,2015, 10 (5): e0125724.
- [23] STAMP L A, GWYNNE R M, FOONG J P P, et al. Optogenetic demonstration of functional innervation of mouse colon by neurons derived from transplanted neural cells[J].*Gastroenterology*,2017, 152 (6): 1407-1418.
- [24] CHENG L S, HOTTA R, GRAHAM H K, et al. Endoscopic delivery of enteric neural stem cells to treat Hirschsprung disease[J].*Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27 (10): 1509-1514.
- [25] ZHAO Y, GE X, YU H, et al. Inhibition of ROCK signaling pathway accelerates enteric neural crest cell-based therapy after transplantation in a rat hypoganglionic model[J].*Neurogastroenterol Motil*,2020, 32 (9): e13895.
- [26] PAWOLSKI V, SCHMIDT M H H. Neuron-glia interaction in the developing and adult enteric nervous system[J].*Cells*, 2020, 10 (1): 47.
- [27] SORET R, SCHNEIDER S, BERNAS G, et al. Glial cell-derived neurotrophic factor induces enteric neurogenesis and improves colon structure and function in mouse models of hirschsprung disease[J].*Gastroenterology*, 2020, 159 (5): 1824-1838.
- [28] SORET R, LASSOUED N, BONNAMOUR G, et al. Genetic background influences severity of colonic aganglionosis and response to gdnf enemas in the holstein mouse model of Hirschsprung disease[J].*Int J Mol Sci*,2021, 22 (23): 13140.
- [29] HUIZINGA J D, HUSSAIN A, CHEN J H. Interstitial cells of Cajal and human colon motility in health and disease[J].*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2021, 321 (5): G552-G575.
- [30] CHEN X, MENG X, ZHANG H, et al. Intestinal proinflammatory macrophages induce a phenotypic switch in interstitial cells of Cajal[J].*J Clin Invest*,2020, 130 (12): 6443-6456.
- [31] MEDRANO G, CAILLEUX F, GUAN P, et al. B-lymphocyte-intrinsic and -extrinsic defects in secretory immunoglobulin a production in the neural crest-conditional deletion of endothelin receptor B model of Hirschsprung-associated enterocolitis[J].*FASEB J*,2019, 33 (6): 7615-7624.
- [32] NEUVONEN M I, KORPELA K, KYRKLUND K, et al. Intestinal microbiota in Hirschsprung disease[J].*J Pediatr Gastroenterol Nutr*,2018, 67 (5): 594-600.
- [33] BHAVE S, ARCIERO E, BAKER C, et al. Enteric neuronal cell therapy reverses architectural changes in a novel diphtheria toxin-mediated model of colonic aganglionosis[J].*Sci Rep*,2019, 9 (1): 18756.
- [34] LEE A S, TANG C, RAO M S, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies[J].*Nat Med*, 2013, 19 (8): 998-1004.
- [35] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges[J].*Cell Stem Cell*, 2020, 27 (4): 523-531.
- [36] BASHOR C J, HILTON I B, BANDUKWALA H, et al. Engineering the next generation of cell-based therapeutics[J].*Nat Rev Drug Discov*,2022, 21 (9): 655-675.
- [37] ALHAWAJ A F. Stem cell-based therapy for hirschsprung disease, do we have the guts to treat?[J].*Gene Ther*,2022, 29 (10-11): 578-587.
- [38] RIVA L, PETRINI C. A few ethical issues in translational research for gene and cell therapy[J].*J Transl Med*,2019, 17 (1): 395.
- [39] IEIRI S, NAKATSUJI T, AKIYOSHI J, et al. Long-term outcomes and the quality of life of Hirschsprung disease in adolescents who have reached 18 years or older--a 47-year single-institute experience[J].*J Pediatr Surg*,2010, 45 (12): 2398-2402.
- [40] THAKKAR H S, BASSETT C, HSU A, et al. Functional outcomes in Hirschsprung disease: a single institution's 12-year experience[J].*J Pediatr Surg*,2017, 52 (2): 277-280.
- [41] LUI K N, NGAN E S. Human pluripotent stem cell-based models for Hirschsprung disease: from 2-d cell to 3-d organoid model[J].*Cells*,2022, 11 (21): 3428.
- [42] SAITO-DIAZ K, ZELTNER N. Induced pluripotent stem cells for disease modeling, cell therapy and drug discovery in genetic autonomic disorders: a review[J].*Clin Auton Res*, 2019, 29 (4): 367-384.