

综 述

星形胶质细胞作为脊髓损伤治疗靶细胞的研究进展

黄 潇, 谷亚坤, 程雪燕, 苏志达*

第二军医大学神经科学研究所, 分子神经生物学教育部重点实验室, 上海 200433

摘 要: 脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)往往导致严重的感觉和运动神经功能障碍, 目前尚无理想的治疗方法。因此, 需要进一步深入研究SCI修复的病理机制, 探索有效的治疗策略, 特别是寻找有效的治疗靶细胞。星形胶质细胞是中枢神经系统(central nervous system, CNS)的一类胶质细胞, 在正常和损伤的CNS中均扮演了重要而复杂的角色, 已成为神经科学家关注的焦点。近年来的研究表明, 星形胶质细胞是SCI治疗的一个理想靶细胞。本文就星形胶质细胞在SCI病理反应中的作用、星形胶质细胞移植以及星形胶质细胞重编程等方面的研究进展作一综述。

关键词: 脊髓损伤; 星形胶质细胞; 细胞移植; 细胞重编程

中图分类号: R338; R744; Q42

Astrocytes as therapeutic targets after spinal cord injury

HUANG Xiao, GU Ya-Kun, CHENG Xue-Yan, SU Zhi-Da*

Institute of Neuroscience and Key Laboratory of Molecular Neurobiology of Ministry of Education, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Spinal cord injury (SCI) is a challenging medical problem in the field of neurology, showing high incidence rate, disability rate, treatment cost and low-aged trend. Despite the clinical application of drug intervention, surgical treatment and modern rehabilitation training, no ideal curative effect has been achieved. Therefore, future study is necessary to clarify detailed pathological mechanism of SCI and identify the potential target cells for therapeutic intervention. In the central nervous system (CNS), astrocytes are the most abundant and widely distributed glial cells which play multiple key roles in maintaining homeostasis of the CNS in physiological and pathological conditions. Increasing evidence indicates that astrocytes are ideal therapeutic target cells for SCI. Here, we review current knowledge of the roles of astrocytes in the pathological reaction after SCI, astroglial transplantation and astrocyte reprogramming.

Key words: spinal cord injury; astrocytes; transplantation; reprogramming

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)造成脊髓解剖结构被破坏, 引起轴突断裂、神经元变性坏死、炎症反应、髓鞘脱失以及胶质增生等一系列病理反应, 最终导致严重的神经功能障碍。急性SCI的基本病理过程分为两个阶段: 原发性损伤和继发性损伤。原发性损伤是致伤因素即刻对脊髓造成机械性破坏, 如脊髓的过度弯曲、拉伸、扭曲或撕裂; 而继

发性损伤发生在原发性损伤后数分钟甚至数周, 在这个阶段, 各种细胞与分子相互作用所形成的代谢和炎症级联反应导致大量的神经元凋亡以及残存的神经纤维脱髓鞘。SCI往往导致损伤节段以下肢体严重的神经功能障碍, 包括不同程度的瘫痪、感觉丧失、顽固性疼痛、溃疡、尿路及其它系统感染等, 严重地影响了患者的生活质量。目前, 临床上主要

Received 2017-03-21 Accepted 2017-08-28

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31671110), Technological Innovation Program (No. 15JC1400202) and Pujiang Program (No. 15PJ1410500) of Shanghai, China.

*Corresponding author. Tel: +86-21-81871042-506; Fax: +86-21-65492132; E-mail: suzhida@smmu.edu.cn

采用药物干预、外科手术以及现代康复训练等一系列综合治疗措施，但尚未取得理想的疗效。因此，需要在深入探索 SCI 病理机制的基础上寻找有效的治疗策略，特别是寻找有效的治疗靶细胞。

近年来，胶质细胞在中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 中的功能逐渐被重视。星形胶质细胞是 CNS 中一类重要的胶质细胞，参与 CNS 的各种神经生理及病理过程。发生 SCI 时，损伤局部星形胶质细胞会被激活而产生反应性细胞增生、肥大，最终形成致密的胶质疤痕，从而影响 SCI 的再生修复^[1, 2]。研究表明，移植未成熟的星形胶质细胞能够减小胶质疤痕的形成，从而促进 SCI 的损伤修复^[3, 4]。另外，随着细胞重编程技术和再生医学的发展，将星形胶质细胞直接转分化为神经元有望成为治疗 SCI 的一种新策略。

1 星形胶质细胞的分类及生理功能

星形胶质细胞在形态上可分为原浆性、纤维性和放射状等三种主要细胞类型。在脑内，星形胶质细胞与其它细胞和组织具有广泛的联系，对神经发育以及 CNS 正常生理功能的维持发挥着重要的作用 (图 1A)。星形胶质细胞能够生成糖原，为神经元提供能量和代谢支持。例如，在额叶皮质和海马神经元附近的星形胶质细胞能够储存和释放糖原，可以在葡萄糖消耗速率高和葡萄糖不足期间为神经元供应能量^[5, 6]。另外，星形胶质细胞能为神经元提供支持和营养。星形胶质细胞从胞体发出许多长而且有分支的突起，伸展充填在神经元的胞体及其突起之间，为轴突生长提供了黏附底物，并起支持和分隔神经元的作用。神经元的电活动可引起局部血流的变化，这个反应被称为神经血管系统耦联。

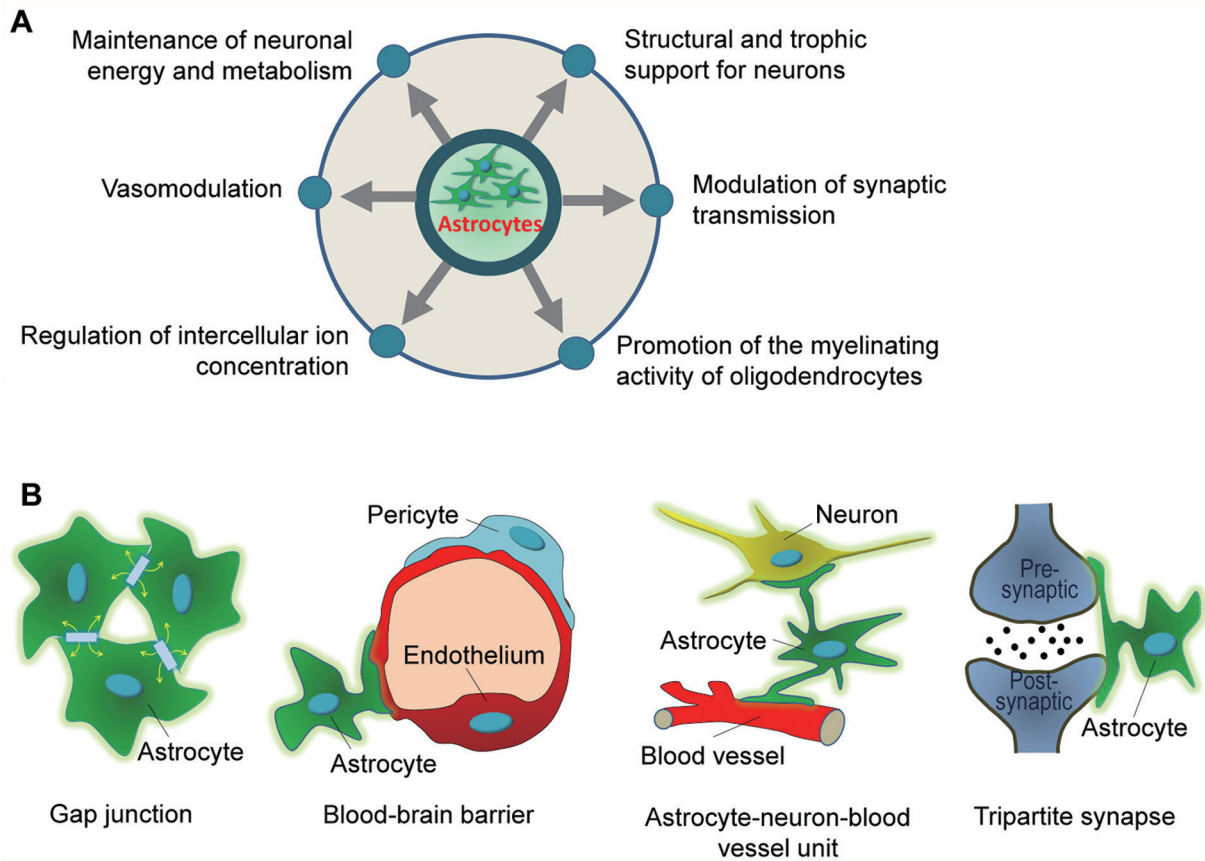


图 1. 星形胶质细胞的生理功能

Fig. 1. Physiological functions of astrocytes. A: Astrocytes perform many essential functions in healthy CNS, including maintenance of neuronal energy and metabolism, structural and trophic support for neurons, vasomodulation, modulation of synaptic transmission, regulation of intercellular ion concentration, and promotion of the myelinating activity of oligodendrocytes. B: Astrocytes contribute to forming some functional structures (e.g. gap junction, blood-brain barrier, astrocyte-neuron-blood vessel unit and tripartite synapse).

脑内的毛细血管被星形胶质细胞的许多突起所包裹, 这些星形胶质细胞在神经元网络和血管网络两个互不连通的系统之间形成一个桥梁, 通过调控神经血管系统耦联在血流和能量代谢过程的调节中发挥重要作用^[7]。在突触形成、维持和消除等过程中, 星形胶质细胞具有重要的调节作用, 并参与形成神经-胶质信息传递网络^[8]。在神经元培养体系中加入星形胶质细胞可以加快突触形成的速度, 增加突触形成的数量, 并在突触形成后调节其成熟^[9, 10]。星形胶质细胞还可以调节细胞外液离子平衡和神经递质循环, 从而维持 CNS 的内稳态。如细胞外谷氨酰胺被神经元吸收, 触发突触释放谷氨酸, 然后被星形胶质细胞吸收, 并再次转化为谷氨酰胺, 该谷氨酸-谷氨酰胺循环回路维持了神经递质浓度的稳定, 为神经网络活动的持续激活提供保证^[11]。此外, 有研究显示星形胶质细胞能促进少突胶质细胞形成髓鞘。神经元的电活动能促使其释放 ATP, 从而诱发髓鞘形成。然而, 该 ATP 并不直接作用于少突胶质细胞, 而是作用于星形胶质细胞, 星形胶质细胞再通过分泌白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 促进少突胶质细胞髓鞘化^[12]。

星形胶质细胞还参与形成一些特殊的功能结构 (图 1B)。在脑内, 星形胶质细胞在神经信息传递过程中具有重要作用。星形胶质细胞之间通过缝隙连接 (gap junction) 形成一个整体, 小分子和离子从缝隙连接处可直接通过, 形成一个特有的类似于合胞体样结构, 从而可以将信号传递到较远的距离。通常情况下, 神经元-星形胶质细胞之间的联系很大程度上依赖于星形胶质细胞的调节。神经元之间、星形胶质细胞之间以及神经元和星形胶质细胞之间可以通过突触或者连接进行相互作用, 或者神经元与星形胶质细胞之间也可以不直接接触而通过释放信号分子的弥散来作用于附近的细胞, 由此形成了信息传递的复杂网络。在某些脑区内, 星形胶质细胞与神经元突触前和突触后终端之间紧密关联, 形成一个由突触前末梢、突触后神经元膜和周围的星形胶质细胞组成的特殊结构——“三组分突触”(tripartite synapse), 该结构使得神经递质不容易泄露, 并允许星形胶质细胞更精确地对突触进行调节^[13–15]。值得注意的是, 通过对突触的调节, 星形胶质细胞能够影响脑的部分高级功能, 如学习和记忆^[16]。另外, 星形胶质细胞还参与形成血-脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 和星形胶质细胞-神经元-

血管单元 (astrocyte-neuron-blood vessel unit)。

2 星形胶质细胞在SCI后的病理反应

2.1 星形胶质细胞活化的病理作用

反应性胶质增生 (reactive astrogliosis) 是星形胶质细胞应对各种病理刺激时产生的一种特殊的活化状态, 对 SCI 的病理过程和再生修复起到重要作用。SCI 后, 损伤处往往会形成由纤维疤痕与胶质疤痕组成的疤痕组织。在胶质疤痕内, 最主要的细胞成份是星形胶质细胞。研究表明, 在 SCI 病理过程中, 星形胶质细胞会被激活, 引起细胞肥大、变形、增殖能力提高以及 GFAP、Nestin、Vimentin 等多种细胞骨架蛋白表达上调, 这些变化随着损伤的严重程度、位置、时间的变化而有所差异, 最终在损伤处形成致密的胶质疤痕^[2, 17, 18]。

胶质疤痕形成是 SCI 病理过程的一个普遍性现象。在成体 CNS 中, 星形胶质细胞过度增生, 会严重影响 CNS 的修复与再生。首先, 活化的星形胶质细胞突起增多、变粗、变长, 这些长而粗的突起紧密地交织在一起, 形成一种致密的胶质疤痕使得再生的神经轴突很难穿越, 从而对神经再生形成一种物理障碍^[19]。其次, 活化的星形胶质细胞还可以分泌肌腱蛋白 (tenascin), 内皮特异性生长因子 ephrin-B2, 以及硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulphate proteoglycan, HSPG)、硫酸皮肤素蛋白多糖 (dermatan sulphate proteoglycan, DSPG)、硫酸角质素蛋白聚糖 (keratan sulphate proteoglycan, KSPG)、硫酸软骨素蛋白聚糖 (chondroitin sulphate proteoglycan, CSPG) 等一大类蛋白多糖^[20–22], 抑制损伤后神经再生, 从而对神经再生形成一种化学障碍。因此, 对活化星形胶质细胞的一些生物学特性进行调控已被认为是治疗 CNS 损伤的一个重要策略。已有研究表明, 调控星形胶质细胞活化、减少胶质疤痕形成或阻断活化星形胶质细胞分泌的神经再生抑制分子, 将有利于中枢神经损伤后的神经再生。Yuan 等研究显示, 姜黄素 (curcumin) 可以通过作用于 NF- κ B 信号通路来抑制星形胶质细胞活化, 从而下调星形胶质细胞分泌、释放 MCP-1、RANTES 和 CXCL10 等趋化因子, 减少巨噬细胞和 T 细胞浸润, 最终减轻 SCI 损伤处的炎症反应, 抑制胶质疤痕的形成和神经再生抑制分子 CSPG 的产生^[23]。另外, 雷公藤内酯醇 (triptolide) 也被证实可以抑制星形胶质细胞的活化和炎症反应, 减少损伤后胶质疤痕的形成, 从而促

进脊髓神经再生和功能恢复^[24]。线粒体分裂在细胞周期调控过程中具有重要的作用, Li 等研究显示线粒体抑制物 Mdivi-1 可以阻断星形胶质细胞的细胞周期, 抑制星形胶质细胞的活化及胶质疤痕形成, 从而促进 SCI 后的神经轴突再生和神经功能修复^[25]。同样, 使用细胞周期抑制剂 Flavopiridol 的乳酸乙醇酸共聚物 (PLGA) 纳米颗粒在受伤部位持续释放 Flavopiridol, 可以抑制星形胶质细胞的增殖分裂, 并减少其合成炎症因子, 从而促进 SCI 的再生修复^[26]。Cafferty 等将 CSPG 的降解酶 chondroitinase ABC (ChABC) 构建在 GFAP 启动子下, 使它在星形胶质细胞中特异性表达, 结果显示 ChABC 能够有效地降解 SCI 后活化星形胶质细胞产生的 CSPG, 从而促进轴突再生和神经功能恢复^[27]。MicroRNAs (miRNAs) 通过转录调控对基因表达起到重要调节作用。研究显示, 发生 SCI 时 miR-17-5p 的表达明显上调, 参与介导活化星形胶质细胞的增殖, 而 *Dicer1* 基因编码一种产生成熟 miRNA 所需的酶, 敲除 *Dicer1* 可以阻断小鼠脊髓横断损伤引起的星形胶质细胞过度增殖^[28]。此外, 越来越多的细胞因子及蛋白如 TSG-6、PCBP2、TCTP、转录因子 Nanog 与纤连蛋白、细胞周期蛋白 CDK6 等已被证实参与星形胶质细胞活化、增殖以及胶质疤痕形成, 但对于它们在这些病理过程中的具体作用还有待进一步深入研究^[29-33]。

2.2 星形胶质细胞活化在SCI后疼痛中的作用

迄今为止, 神经性疼痛机制不明, 但可以肯定的是其与星形胶质细胞有关。在经典外周神经损伤导致触痛模型中, 大鼠脊髓背角星形胶质细胞有短暂的增殖, 这种增殖与 JAK-STAT3 信号通路有关, 而鞘内注射抑制星形胶质细胞增殖的试剂可以使触痛有所缓解^[34]。中枢性疼痛症候群 (central pain syndrome, CPS) 是 SCI 后患者的常见症状, 在大鼠颈段挫伤 SCI 导致慢性热痛觉过敏的神经性疼痛模型中, 与只进行椎板切除的未损伤组相比, 二者虽都伴有背侧脊髓丘脑束 (spinothalamic tract, STT) 神经元的活化, 但前者在浅表背根神经节还伴有星形胶质细胞的活化以及谷氨酸转运子 (GLT1) 表达的丢失^[35], 并且小胶质细胞与 SCI 引起的早期中枢性疼痛有关, 而星形胶质细胞则在晚期中枢性疼痛中起关键作用^[36]。SCI 后, 星形胶质细胞的 sigma-1 受体被激活, 介导其缝隙连接蛋白 CX43 表达上调, 从而导致疼痛。星形胶质细胞的代谢抑制物 (氧柠

檬酸)、缝隙连接 / 半通道阻滞剂 (甘珀酸酮) 或者 CX43 模拟肽 (43Gap26) 均能够显著减轻 SCI 所引起的疼痛^[37]。

2.3 星形胶质细胞活化的神经保护作用

虽然传统的观点一直认为星形胶质细胞活化形成的胶质疤痕抑制轴突再生, 但也有学者认为这是一种自我修复过程, 星形胶质细胞活化并在损伤处形成胶质疤痕可以维持和重建 CNS 的完整性, 隔离周围健康神经组织, 使其避免受损伤中心炎症和毒性物质的损害, 并有营养及支持等抗损伤作用。Anderson 等研究显示, 抑制胶质疤痕的形成并不能促进下行皮质脊髓束、上行感觉神经束和 5-羟色胺能神经束等三种脊髓内主要神经轴突再生。相反, 适量的胶质疤痕形成可以促进神经轴突再生。该研究还指出, SCI 后 CSPG 并非由星形胶质细胞产生^[38]。近年来, 星形胶质细胞的神经元保护作用已被证实, 活化的星形胶质细胞会分泌各种因子来直接支持和保护受损伤的神经元^[39, 40]。Teshigawara 等研究显示, 化合物 Denosomin 可以促进星形胶质细胞的增殖, 抑制其凋亡, 并提高能够分泌 Vimentin 的星形胶质细胞的比例^[41], 而分泌到细胞外基质中的 Vimentin 与细胞内作为细胞骨架蛋白的 Vimentin 作用有所差异, 它可以促进 SCI 后脊髓神经轴突再生和神经功能修复^[42]。另外, 活化的星形胶质细胞在调节炎症反应中也发挥了重要作用, 它们除了通过释放促炎因子参与损伤局部炎症反应, 还可以通过产生抗炎因子以及神经营养因子来保护神经元^[43, 44]; 活化的星形胶质细胞还可以产生白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)、骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 以及白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等一些细胞因子参与调节神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 分化^[45]。

3 星形胶质细胞移植在SCI治疗中的作用

由于星形胶质细胞在生理与病理条件下所具有的重要作用, 神经科学家认为移植星形胶质细胞将有助于促进 SCI 后的神经再生修复^[46]。Joosten 等用胶原蛋白作为载体将新生星形胶质细胞移植到成年大鼠的损伤脊髓中, 发现它能促进脊髓神经再生和轻度的运动功能恢复^[3]。Pencalet 等用表达荧光蛋白 GFP 的慢病毒感染体外培养的成年大鼠皮层星形胶质细胞对其进行标记, 然后将这些 GFP 标记的成年星形胶质细胞移植到受损脊髓, 结果发现

移植的星形胶质细胞在受损的脊髓内可以存活、迁移,提示它在 SCI 治疗中可能有潜在的应用价值^[47]。

近年来,有学者提出应用胶质限制性前体细胞 (glial-restricted precursors, GRPs) 来源的星形胶质细胞 (GRPs-derived astrocytes, GDAs) 移植治疗 SCI 能取得更好的效果。例如, Davies 等提出先在体外用骨形态发生蛋白 -4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4) 对 GRPs 进行诱导预分化获得 GDAs, 再移植入被损伤的大鼠脊髓内。这些移植的 GDAs 明显抑制胶质疤痕形成, 缓解损伤处神经元的退变, 并促进神经轴突再生和功能恢复, 与未进行预分化的 GRPs 直接移植相比效果更佳^[48]。后来, Davies 等还用 CNTF 对 GRPs 进行预分化获得 GDAs, 但移植这些 GDAs 不仅不能促进脊髓神经轴突再生和功能恢复, 而且还会诱发 SCI 后机械性疼痛和热痛觉过敏, 这跟直接移植未预分化的 GRPs 所引起的疼痛类似^[49]。然而, Fischer 等在同样的实验条件下发现 CNTF 和 BMP-4 诱导预分化获得的 GDAs 一样都能沿着脊髓白质内的神经束迁移, 并同等程度地促进神经轴突生长^[50]。为何两者实验所获得的 GDAs 有不同特性, 目前尚不清楚。可能的原因是: 首先 BMP-4 与 CNTF 诱导预分化所得的 GDAs 可能属于星形胶质细胞的不同特异性亚群, 前者为 $A_2B_5^-/GFAP^+$ 星形胶质细胞, 而后者是 $A_2B_5^+/GFAP^+$ 星形胶质细胞。其次, BMP-4 与 CNTF 激活不同的信号传导通路, 前者激活 BMP/Smad 通路^[51, 52], 而后者则激活 JAK-STAT 通路^[53]。另外, BMP-4 诱导预分化所得 GDAs 中含有脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF), 这种因子在出生后皮层星形胶质细胞内并不存在; BMP-4 诱导预分化所得 GDAs 还可以分泌骨膜蛋白 Periostin, 它能促进神经轴突生长^[48, 54–56]。

在星形胶质细胞移植治疗啮齿动物 SCI 的研究基础上, 人星形胶质细胞移植的相关研究也逐渐开展起来了, 这将为其实临床应用打下坚实的基础。Jin 等用 BMP-4 对胎儿脑来源的星形胶质细胞前体细胞 (human GRPs, hGRPs) 进行诱导预分化获得人 GDAs (human GDAs, hGDAs), 然后将 hGRPs 与 hGDAs 分别移植到小鼠 SCI 模型中, 8 周后发现 hGRPs 与 hGDAs 都能在脊髓内大量存活和广泛迁移, 两组动物在损伤区域内的空洞和疤痕形成均变小了, 并且没有诱发神经性疼痛, 只是在提高运动功能方面效果不明显^[57]。Davies 等也对 SCI 后移植 hGRPs 与

hGDAs 进行了研究, 他们发现 hGRPs 与 hGDAs 在促进神经轴突生长、神经保护以及功能恢复等方面的作用存在差异, 其结果与他们对移植鼠 GRPs 与 GDAs 的研究结果类似^[58]。然而, Haas 与 Fischer 则认为不管是移植 BMP-4 或 CNTF 诱导 hGRPs 预分化所得 hGDAs 还是直接移植未进行预分化的 hGRPs 均能在脊髓内存活, 并且都能促进 SCI 后的神经轴突再生^[59]。

另外, 人类胚胎干细胞 (human embryonic stem cells, hESCs) 来源的星形胶质细胞移植到 SCI 脊髓内也能够很好地存活并整合, 其功能与野生型星形胶质细胞没有明显差异。但是, 采用不同的方法对 hESCs 诱导分化所获得的星形胶质细胞效率有所不同, 加入成纤维生长因子 1 (fibroblast growth factor-1, FGF1) 或成纤维生长因子 2 (fibroblast growth factor-2, FGF2) 可以提高星形胶质细胞的成熟效率^[60–62]。Das 等研究表明, 将胚胎来源的人类神经祖细胞 (human neural progenitor cells, hNPCs) 移植到老年大鼠脊髓内, 与移植到年轻大鼠脊髓内相比, 它们存活并分化为成熟星形胶质细胞的数量较多, 并且能够防止与衰老相关的运动神经元变性丢失, 提示老化环境可以刺激星形胶质细胞分化成熟^[63]。近年来, 研究者成功地利用诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 获得星形胶质细胞。Hayashi 等将小鼠 iPSC 诱导分化所得的星形胶质细胞移植到大鼠 SCI 模型中, 大鼠的运动功能没有明显得到修复, 而其神经性疼痛反而加重^[64]。Haidet-Phillips 等将人 iPSC 来源的星形胶质细胞前体细胞移植到正常小鼠脊髓中, 发现它们至少可以存活 12 周, 并且 90% 能够分化为成熟的星形胶质细胞^[65]。进一步研究表明, 在大鼠与小鼠颈段挫伤的脊髓内移植人 iPSC 来源的星形胶质细胞可以显著地改善其呼吸功能^[66]。由此可见, 不同来源星形胶质细胞的移植对 SCI 的治疗效果存在差异, 这不仅与进行诱导分化的细胞种类、诱导分化的微环境有关, 还可能与种属来源有关。在众多的细胞来源中, iPSC 由于避开了使用 hESCs 所面临的一系列伦理问题, 并且可以大规模地诱导分化制备星形胶质细胞, 从而具备了显著的优势。

4 星形胶质细胞重编程在 SCI 治疗中的作用

干细胞广泛应用于再生医学领域, 给 SCI 治疗带来了希望。但是, 在干细胞应用过程中面临着诸

多障碍，比如伦理问题、免疫排斥和成瘤风险等。细胞重编程技术是近年来出现的一项生物学新技术，利用该技术能将动物或人的自身体细胞诱导转分化为 NSCs 以及各种不同类型的神经元，从而避开上述伦理学和免疫排斥等问题，对 SCI 治疗具有广泛的应用价值。目前，成纤维细胞是细胞重编程中应用较多的一类细胞。相对于成纤维细胞，星形胶质细胞与神经元的细胞谱系更接近，因此理论上也更容易被重编程为神经元。

目前，有关星形胶质细胞的重编程方法主要是利用转录因子、miRNA 和小分子化合物等进行操作（表 1，表 2）。2006 年，Takahashi 和 Yamanaka 第一次通过过表达 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 四种转录因子，将体外培养的鼠成纤维细胞重编程为 iPSC^[67]。后来，Ruiz 等研究显示，这四个转录因子也可以将人的星形胶质细胞重编程为 iPSC^[68]。Corti 等在人星形胶质细胞中外源性导入 OCT4、Sox2 或 Nanog，发现它们可以有效地将星形胶质细胞转化为 NSCs，该重编程过程不需要经历 iPSC 阶段，从而避开了 iPSC 所带来的一些不利影响，如导致畸

胎瘤的形成^[69]。Heins 等研究表明，单个转录因子 Pax6 就能将星形胶质细胞直接转分化成神经元^[70]。值得注意的是，不同转录因子介导的星形胶质细胞重编程可以得到不同亚型的神经元。例如，在星形胶质细胞中导入 Ngn2 可获得谷氨酸能神经元，而导入 Ascl1 或 Dlx2 则可得到多巴胺能神经元，这些重编程获得的神经元不仅能发放动作电位，还能形成功能性神经突触联系^[71-73]。进一步研究表明，利用转录因子也能在体内对星形胶质细胞进行重编程。Torper 等研究显示，利用 Ascl1、Brn2 和 Myt1l 等三个转录因子可以直接将小鼠体内的星形胶质细胞重编程为神经元^[74]。另外，利用单个转录因子 Sox2 也能够将脑内和脊髓内的成年小鼠星形胶质细胞重编程为神经元，这为体内原位细胞重编程治疗 CNS 损伤带来了希望^[75-77]。

miRNA 在细胞重编程中发挥的作用开始被研究者所关注。Li 等在使用 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 四种转录因子诱导 iPSC 时加入 miR-93 和 miR-106b，发现它们能有效提高 iPSC 的产生效率^[78]。Xu 等研究显示，miR-145 在自我更新的 hESCs 中

表1. 转录因子或小分子化合物介导的星形胶质细胞体外重编程
Table 1. *In vitro* reprogramming of astrocyte by transcription factor or compound

Astrocytes	Transcription factor or compound	Induced cells	References
Postnatal mouse cortical astrocytes	Ascl1, Dlx2	GABAergic neurons	[71, 73]
Postnatal mouse cortical astrocytes	Ngn2	Glutamatergic neurons	[71, 73]
Postnatal mouse cortical astrocytes	NeuroD1	Glutamatergic neurons	[86]
Postnatal mouse midbrain astrocytes	Ascl1	GABAergic neurons	[87]
Human astrocytes	NeuroD1	Glutamatergic neurons	[86]
Human cortical astrocytes	Oct4, Sox2, Nanog	Neural stem cells	[69]
Human astrocytes	LDN193189, SB431542, TTNPB, Tzv, CHIR99021, DAPT, VPA, SAG, Purmo	Glutamatergic (88.3%) and GABAergic (8.2%) neurons	[84]
Human astrocytes	VPA, CHIR99021, Repsox, Forskolin, i-Bet151, ISX-9	Glutamatergic (70%) and cholinergic (7%) neurons	[85]

表2. 转录因子介导的星形胶质细胞体内重编程
Table 2. *In vivo* reprogramming of astrocyte by transcription factor

Astrocytes	Transcription factor	Induced cells	References
Adult rat striatal and neocortex astrocytes	Ngn2	Neurons	[88]
Adult mouse cortical astrocytes	NeuroD1	Glutamatergic neurons	[86]
Adult mouse cortical astrocytes	Ngn2	Glutamatergic neurons	[89]
Adult mouse midbrain astrocytes	Ascl1	GABAergic neurons	[87]
Adult mouse striatal astrocytes	Sox2	Neuroblasts	[75]
Adult mouse spinal astrocytes	Sox2	Neuroblasts	[77]
Human astrocytes	Ascl1, Brn2, Myt1l	Neurons	[74]

低表达,但在分化过程中其表达显著上调。Oct4、Sox2 和 Klf4 是 miR-145 的直接作用靶点,增加 miR-145 的表达可以抑制 hESCs 的自我更新并导致其分化,同时促进 Oct4、Sox2 和 Klf4 的表达,这提示了 miR-145 与某些关键重编程因子之间有直接联系^[79]。miRNA 调节基因重编程有多种途径,包括调控细胞增殖、凋亡、染色体重塑、表皮间质转化等^[80]。在细胞重编程的过程中,许多 miRNA 在早期的表达只有微小的变化,而少数 miRNA 在重编程后期则有较明显变化,这表明 miRNA 在重编程期间的调节作用具有高度的阶段依赖性^[81, 82]。

相比转录因子和 miRNA,小分子化合物在细胞重编程中的应用更被研究者们青睐,因为它们具有许多优点:(1)容易在体外合成,而且费用低;(2)使用方便,更加适用于临床;(3)分子小,容易透过细胞;(4)能更大程度地在时间和空间上控制蛋白功能;(5)可以通过改变它们的浓度和组合来进行微调^[83]。Zhang 等通过一系列筛选,发现 LDN193189、SB431542、TTNPB、Tzv、CHIR99021、DAPT、VPA、SAG 和 Purmo 等九种小分子化合物组合可以直接将人星形胶质细胞重编程为神经元,这些神经元在体外可以存活至少五个月并形成神经突触,当移植到小鼠体内时能够很好地整合到已有的神经环路中^[84]。Gao 等研究表明,VPA、CHIR99021、Repsox、Forskolin、i-Bet151 和 ISX-9 等六个小分子化合物组合能够将人成体星形胶质细胞重编程为神经元,该神经元移植到小鼠体内后可以存活并具备神经元特有的电生理特性^[85]。不同的 CNS 疾病累及不同的神经元,比如帕金森病主要累及多巴胺能神经元,老年痴呆症主要累及基底前脑神经元,而 SCI 主要累及运动前角神经元和中间神经元。因此,我们需要进一步深入探索使用不同的化合物组合将星形胶质细胞有效地重编程为不同神经系统疾病所需的特定亚型的神经元。

SCI 导致大量神经元不可逆丧失和局部神经环路被破坏是造成严重神经功能障碍的主要原因。因此,探索如何补充、替代这些丢失的神经元并重建局部神经环路是有效修复 SCI 的最大挑战。目前,通过移植一些干细胞来源的神经前体细胞或神经元是治疗 SCI 的一个重要手段,但仍面临免疫排斥反应、伦理学障碍和成瘤风险等诸多挑战。而且,细胞移植治疗往往需要的细胞量比较大,注射到脊髓内可能会对脊髓造成二次损伤。星形胶质细胞是

CNS 内分布最广、数量最多的一类胶质细胞。如上所述,SCI 时星形胶质细胞往往会被激活,产生反应性细胞增生、肥大,最终在损伤处形成一个致密的胶质疤痕,对神经再生形成物理和化学障碍。如果能够在损伤的脊髓内通过细胞重编程手段将这些过度活化的星形胶质细胞转分化为神经元,这不仅能够补充 SCI 时丢失的神经元,而且能减少胶质疤痕形成,从而有利于促进 SCI 修复。近年来,研究人员突破了重重技术难关,实现了将损伤脊髓内的星形胶质细胞重编程为神经元。但是,要将体内星形胶质细胞重编程应用于治疗 SCI 还面临着许多难题。例如,脊髓内星形胶质细胞重编程所得神经元能不能长期存活?星形胶质细胞能不能重编程为特定类型的神经元?这些重编程来源的神经元有没有功能?能不能重建 SCI 处的神经环路并最终促进脊髓神经功能恢复?所有这些问题都有待进一步深入研究。

5 总结与展望

近年来,胶质细胞在 CNS 中的生理和病理作用已逐渐引起重视。随着对星形胶质细胞生物学特性、星形胶质细胞在 SCI 病理过程中的作用以及星形胶质细胞重编程等方面的深入研究,该细胞已逐渐成为 SCI 治疗潜在的一个重要靶细胞。不同损伤类型和不同损伤程度的 SCI,星形胶质细胞的病理反应存在差异,在 SCI 不同病理阶段星形胶质细胞的反应和作用也是不同的。因此,把握好干预星形胶质细胞的时间窗对 SCI 治疗具有重要意义。星形胶质细胞移植已被证实有助于 SCI 的神经再生修复,但其作用机制以及何种来源星形胶质细胞作用比较理想还有待进一步研究。此外,星形胶质细胞重编程治疗 SCI 是最近才出现的一项技术,相对于传统的转录因子或 miRNA,小分子化合物在细胞重编程中具有明显的优势,应该进一步加强对小分子化合物诱导星形胶质细胞重编程的探索。

参考文献

- 1 Karimi-Abdolrezaee S, Billakanti R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. *Mol Neurobiol* 2012; 46(2): 251–264.
- 2 Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32(12): 638–647.
- 3 Joosten EA, Veldhuis WB, Hamers FP. Collagen containing

- neonatal astrocytes stimulates regrowth of injured fibers and promotes modest locomotor recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2004; 77(1): 127–142.
- 4 Wang JJ, Chuah MI, Yew DT, Leung PC, Tsang DS. Effects of astrocyte implantation into the hemisectioned adult rat spinal cord. *Neuroscience* 1995; 65(4): 973–981.
 - 5 Weber B, Barros LF. The astrocyte: powerhouse and recycling center. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(12). pii: a020396. doi: 10.1101/cshperspect.a020396.
 - 6 Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 2007; 55(12): 1263–1271.
 - 7 Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 2007; 10(11): 1369–1376.
 - 8 Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes control synapse formation, function, and elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7(9): a020370.
 - 9 Hu R, Cai WQ, Wu XG, Yang Z. Astrocyte-derived estrogen enhances synapse formation and synaptic transmission between cultured neonatal rat cortical neurons. *Neuroscience* 2007; 144(4): 1229–1240.
 - 10 Diniz LP, Tortelli V, Garcia MN, Araujo AP, Melo HM, Silva GS, Felice FG, Alves-Leon SV, Souza JM, Romao LF, Castro NG, Gomes FC. Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling. *Glia* 2014; 62(12): 1917–1931.
 - 11 Fleischer W, Theiss S, Schnitzler A, Sergeeva O. Glutamine triggers long-lasting increase in striatal network activity *in vitro*. *Exp Neurol* 2017; 290: 41–52.
 - 12 Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 2006; 49(6): 823–832.
 - 13 Danbolt NC, Furness DN, Zhou Y. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem Int* 2016; 98: 29–45.
 - 14 Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia—living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2011; 79(10): 588–597 (in German with English abstract).
 - 15 Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 2007; 13(2): 54–63.
 - 16 Orr AG, Hsiao EC, Wang MM, Ho K, Kim DH, Wang X, Guo W, Kang J, Yu GQ, Adame A, Devidze N, Dubal DB, Masliah E, Conklin BR, Mucke L. Astrocytic adenosine receptor A and G-coupled signaling regulate memory. *Nat Neurosci* 2015; 18(3): 423–434.
 - 17 Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119(1): 7–35.
 - 18 Sofroniew MV. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 7(2): a020420.
 - 19 Windle WF, Chambers WW. Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. *J Comp Neurol* 1950; 93(2): 241–257.
 - 20 Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW. Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 2002; 137: 313–332.
 - 21 Jones LL, Sajed D, Tuszynski MH. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci* 2003; 23(28): 9276–9288.
 - 22 Yuan YM, He C. The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci Bull* 2013; 29(4): 421–435.
 - 23 Yuan J, Liu W, Zhu H, Chen Y, Zhang X, Li L, Chu W, Wen Z, Feng H, Lin J. Curcumin inhibits glial scar formation by suppressing astrocyte-induced inflammation and fibrosis *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res* 2017; 1655: 90–103.
 - 24 Su Z, Yuan Y, Cao L, Zhu Y, Gao L, Qiu Y, He C. Triptolide promotes spinal cord repair by inhibiting astrogliosis and inflammation. *Glia* 2010; 58(8): 901–915.
 - 25 Li G, Cao Y, Shen F, Wang Y, Bai L, Guo W, Bi Y, Lv G, Fan Z. Mdivi-1 inhibits astrocyte activation and astroglial scar formation and enhances axonal regeneration after spinal cord injury in rats. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 241.
 - 26 Ren H, Han M, Zhou J, Zheng ZF, Lu P, Wang JJ, Wang JQ, Mao QJ, Gao JQ, Ouyang HW. Repair of spinal cord injury by inhibition of astrocyte growth and inflammatory factor synthesis through local delivery of flavopiridol in PLGA nanoparticles. *Biomaterials* 2014; 35(24): 6585–6594.
 - 27 Cafferty WB, Yang SH, Duffy PJ, Li S, Strittmatter SM. Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci* 2007; 27(9): 2176–2185.
 - 28 Hong P, Jiang M, Li H. Functional requirement of dicer1 and miR-17-5p in reactive astrocyte proliferation after spinal cord injury in the mouse. *Glia* 2014; 62(12): 2044–2060.
 - 29 Coulson-Thomas VJ, Lauer ME, Soleman S, Zhao C, Hascall VC, Day AJ, Fawcett JW. Tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) is constitutively expressed in adult central nervous system (CNS) and associated with astrocyte-mediated glial scar formation following spinal cord injury. *J Biol Chem* 2016; 291(38): 19939–19952.
 - 30 Mao X, Liu J, Chen C, Zhang W, Qian R, Chen X, Lu H, Ge J, Zhao C, Zhang D, Wang Y. PCBP2 modulates neural apoptosis and astrocyte proliferation after spinal cord injury. *Neurochem Res* 2016; 41(9): 2401–2414.
 - 31 Gu J, Ni Y, Xu L, Xu H, Cai Z. Nanog interact with CDK6 to regulates astrocyte cells proliferation following spinal cord injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 469(4): 1097–1103.

- 32 Ren J, Mao X, Chen M, Zhang W, Liu Y, Duan C, Zhang H, Sun C, Wu W, Zhu X, Ge J, Tao W, Wang Y, Lu H. TCTP expression after rat spinal cord injury: implications for astrocyte proliferation and migration. *J Mol Neurosci* 2015; 57(3): 366–375.
- 33 Xia M, Zhu Y. Fibronectin enhances spinal cord astrocyte proliferation by elevating P2Y1 receptor expression. *J Neurosci Res* 2014; 92(8): 1078–1090.
- 34 Tsuda M, Kohro Y, Yano T, Tsujikawa T, Kitano J, Tozaki-Saitoh H, Koyanagi S, Ohdo S, Ji RR, Salter MW, Inoue K. JAK-STAT3 pathway regulates spinal astrocyte proliferation and neuropathic pain maintenance in rats. *Brain* 2011; 134(Pt 4): 1127–1139.
- 35 Putatunda R, Hala TJ, Chin J, Lepore AC. Chronic at-level thermal hyperalgesia following rat cervical contusion spinal cord injury is accompanied by neuronal and astrocyte activation and loss of the astrocyte glutamate transporter, GLT1, in superficial dorsal horn. *Brain Res* 2014; 1581: 64–79.
- 36 Naseri K, Saghaei E, Abbaszadeh F, Afhami M, Haeri A, Rahimi F, Jorjani M. Role of microglia and astrocyte in central pain syndrome following electrolytic lesion at the spinothalamic tract in rats. *J Mol Neurosci* 2013; 49(3): 470–479.
- 37 Choi SR, Roh DH, Yoon SY, Kwon SG, Choi HS, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice. *Ann Rehabil Med* 2016; 111: 34–46.
- 38 Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 2016; 532(7598): 195–200.
- 39 Li Y, Liu Z, Xin H, Chopp M. The role of astrocytes in mediating exogenous cell-based restorative therapy for stroke. *Glia* 2014; 62(1): 1–16.
- 40 Lu X, Al-Aref R, Zhao D, Shen J, Yan Y, Gao Y. Astrocyte-conditioned medium attenuates glutamate-induced apoptotic cell death in primary cultured spinal cord neurons of rats. *Neurol Res* 2015; 37(9): 803–808.
- 41 Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br J Pharmacol* 2013; 168(4): 903–919.
- 42 Shigyo M, Tohda C. Extracellular vimentin is a novel axonal growth facilitator for functional recovery in spinal cord-injured mice. *Sci Rep* 2016; 6: 28293.
- 43 Karthikeyan A, Patnala R, Jadhav SP, Eng-Ang L, Dheen ST. MicroRNAs: key players in microglia and astrocyte mediated inflammation in CNS pathologies. *Curr Med Chem* 2016; 23(30): 3528–3546.
- 44 Kang SS, Keasey MP, Arnold SA, Reid R, Gerald J, Hagg T. Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice. *Neurobiol Dis* 2013; 49: 68–78.
- 45 Wang FW, Hao HB, Zhao SD, Zhang YM, Liu Q, Liu HJ, Liu SM, Yuan QH, Bing LJ, Ling EA, Hao AJ. Roles of activated astrocyte in neural stem cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Res* 2011; 7(1): 41–53.
- 46 Chu T, Zhou H, Li F, Wang T, Lu L, Feng S. Astrocyte transplantation for spinal cord injury: current status and perspective. *Brain Res Bull* 2014; 107: 18–30.
- 47 Peneale P, Serguera C, Corti O, Privat A, Mallet J, Giménez y Ribotta M. Integration of genetically modified adult astrocytes into the lesioned rat spinal cord. *J Neurosci Res* 2006; 83(1): 61–67.
- 48 Davies JE, Huang C, Proschel C, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies SJ. Astrocytes derived from glial-restricted precursors promote spinal cord repair. *J Biol* 2006; 5(3): 7.
- 49 Davies JE, Proschel C, Zhang N, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies SJ. Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. *J Biol* 2008; 7(7): 24.
- 50 Haas C, Neuhuber B, Yamagami T, Rao M, Fischer I. Phenotypic analysis of astrocytes derived from glial restricted precursors and their impact on axon regeneration. *Exp Neurol* 2012; 233(2): 717–732.
- 51 Fuller ML, DeChant AK, Rothstein B, Caprariello A, Wang R, Hall AK, Miller RH. Bone morphogenetic proteins promote gliosis in demyelinating spinal cord lesions. *Ann Neurol* 2007; 62(3): 288–300.
- 52 Xiao Q, Du Y, Wu W, Yip HK. Bone morphogenetic proteins mediate cellular response and, together with Noggin, regulate astrocyte differentiation after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2010; 221(2): 353–366.
- 53 Seo H, Lee K. Epac2 contributes to PACAP-induced astrocytic differentiation through calcium ion influx in neural precursor cells. *BMB Rep* 2016; 49(2): 128–133.
- 54 Noble M, Davies JE, Mayer-Proschel M, Proschel C, Davies SJ. Precursor cell biology and the development of astrocyte transplantation therapies: lessons from spinal cord injury. *Neurotherapeutics* 2011; 8(4): 677–693.
- 55 Rolls A, Shechter R, London A, Segev Y, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Schwartz M. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. *PLoS Med* 2008; 5(8): e171.
- 56 Shih CH, Lacagnina M, Leuer-Biscioti K, Proschel C. Astroglial-derived periostin promotes axonal regeneration after

- spinal cord injury. *J Neurosci* 2014; 34(7): 2438–2443.
- 57 Jin Y, Neuhuber B, Singh A, Bouyer J, Lepore A, Bonner J, Himes T, Campanelli JT, Fischer I. Transplantation of human glial restricted progenitors and derived astrocytes into a contusion model of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2011; 28(4): 579–594.
 - 58 Davies SJ, Shih CH, Noble M, Mayer-Proschel M, Davies JE, Proschel C. Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 2011; 6(3): e17328.
 - 59 Haas C, Fischer I. Human astrocytes derived from glial restricted progenitors support regeneration of the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 2013; 30(12): 1035–1052.
 - 60 Krencik R, Weick JP, Liu Y, Zhang ZJ, Zhang SC. Specification of transplantable astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(6): 528–534.
 - 61 Shaltouki A, Peng J, Liu Q, Rao MS, Zeng X. Efficient generation of astrocytes from human pluripotent stem cells in defined conditions. *Stem Cells* 2013; 31(5): 941–952.
 - 62 Roybon L, Lamas NJ, Garcia-Diaz A, Yang EJ, Sattler R, Jackson-Lewis V, Kim YA, Kachel CA, Rothstein JD, Przedborski S, Wichterle H, Henderson CE. Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep* 2013; 4(5): 1035–1048.
 - 63 Das MM, Avalos P, Suezaki P, Godoy M, Garcia L, Chang CD, Vit JP, Shelley B, Gowing G, Svendsen CN. Human neural progenitors differentiate into astrocytes and protect motor neurons in aging rats. *Exp Neurol* 2016; 280: 41–49.
 - 64 Hayashi K, Hashimoto M, Koda M, Naito AT, Murata A, Okawa A, Takahashi K, Yamazaki M. Increase of sensitivity to mechanical stimulus after transplantation of murine induced pluripotent stem cell-derived astrocytes in a rat spinal cord injury model. *J Neurosurg Spine* 2011; 15(6): 582–593.
 - 65 Haidet-Phillips AM, Roybon L, Gross SK, Tuteja A, Donnelly CJ, Richard JP, Ko M, Sherman A, Eggan K, Henderson CE, Maragakis NJ. Gene profiling of human induced pluripotent stem cell-derived astrocyte progenitors following spinal cord engraftment. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(5): 575–585.
 - 66 Li K, Javed E, Scura D, Hala TJ, Seetharam S, Fahnrikar A, Richard JP, Chorath A, Maragakis NJ, Wright MC, Lepore AC. Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2015; 271: 479–492.
 - 67 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.
 - 68 Ruiz S, Brennand K, Panopoulos AD, Herreras A, Gage FH, Izpisua-Belmonte JC. High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes. *PLoS One* 2010; 5(12): e15526.
 - 69 Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Donadoni C, Salani S, Rizzo F, Nardini M, Riboldi G, Magri F, Zanetta C, Faravelli I, Bresolin N, Comi GP. Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp Cell Res* 2012; 318(13): 1528–1541.
 - 70 Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 2002; 5(4): 308–315.
 - 71 Heinrich C, Blum R, Gascon S, Masserdotti G, Tripathi P, Sanchez R, Tiedt S, Schroeder T, Gotz M, Berninger B. Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* 2010; 8(5): e1000373.
 - 72 Heinrich C, Gascon S, Masserdotti G, Lepier A, Sanchez R, Simon-Ebert T, Schroeder T, Gotz M, Berninger B. Generation of subtype-specific neurons from postnatal astroglia of the mouse cerebral cortex. *Nat Protoc* 2011; 6(2): 214–228.
 - 73 Berninger B, Costa MR, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, Gotz M. Functional properties of neurons derived from *in vitro* reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* 2007; 27(32): 8654–8664.
 - 74 Torper O, Pfisterer U, Wolf DA, Pereira M, Lau S, Jakobsson J, Bjorklund A, Grealish S, Parmar M. Generation of induced neurons via direct conversion *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(17): 7038–7043.
 - 75 Niu W, Zang T, Zou Y, Fang S, Smith DK, Bachoo R, Zhang CL. *In vivo* reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain. *Nat Cell Biol* 2013; 15(10): 1164–1175.
 - 76 Niu W, Zang T, Smith DK, Vue TY, Zou Y, Bachoo R, Johnson JE, Zhang CL. SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain. *Stem Cell Reports* 2015; 4(5): 780–794.
 - 77 Su Z, Niu W, Liu ML, Zou Y, Zhang CL. *In vivo* conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nat Commun* 2014; 5: 3338.
 - 78 Li Z, Yang CS, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 2011; 30(5): 823–834.
 - 79 Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009; 137(4): 647–658.
 - 80 Anokye-Danso F, Snitow M, Morrissey EE. How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt18): 4179–4187.
 - 81 Henzler CM, Li Z, Dang J, Arcila ML, Zhou H, Liu J, Chang KY, Bassett DS, Rana TM, Kosik KS. Staged miRNA re-regulation patterns during reprogramming. *Genome Biol* 2013;

- 14(12): R149.
- 82 Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinton D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S, Hochedlinger K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 2012; 151(7): 1617–1632.
- 83 Li W, Li K, Wei W, Ding S. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell* 2013; 13(3): 270–283.
- 84 Zhang L, Yin JC, Yeh H, Ma NX, Lee G, Chen XA, Wang Y, Lin L, Chen L, Jin P, Wu GY, Chen G. Small molecules efficiently reprogram human astroglial cells into functional neurons. *Cell Stem Cell* 2015; 17(6): 735–747.
- 85 Gao L, Guan W, Wang M, Wang H, Yu J, Liu Q, Qiu B, Yu Y, Ping Y, Bian X, Shen L, Pei G. Direct generation of human neuronal cells from adult astrocytes by small molecules. *Stem Cell Reports* 2017; 8(3): 538–547.
- 86 Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. *In vivo* direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 2014; 14(2): 188–202.
- 87 Liu Y, Miao Q, Yuan J, Han S, Zhang P, Li S, Rao Z, Zhao W, Ye Q, Geng J, Zhang X, Cheng L. Ascl1 converts dorsal midbrain astrocytes into functional neurons *in vivo*. *J Neurosci* 2015; 35(25): 9336–9355.
- 88 Grande A, Sumiyoshi K, Lopez-Juarez A, Howard J, Sakthivel B, Aronow B, Campbell K, Nakafuku M. Environmental impact on direct neuronal reprogramming *in vivo* in the adult brain. *Nat Commun* 2013; 4: 2373.
- 89 Gascon S, Murenu E, Masserdotti G, Ortega F, Russo GL, Petrik D, Deshpande A, Heinrich C, Karow M, Robertson SP, Schroeder T, Beckers J, Irmeler M, Berndt C, Angeli JP, Conrad M, Berninger B, Gotz M. Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell* 2016; 18(3): 396–409.