

干细胞治疗先天性巨结肠的研究进展

陈芸琪¹, 郭瑶瑶¹, 栾志勇²

1. 长春中医药大学临床医学院, 吉林长春 130117; 2. 长春中医药大学附属医院儿童诊疗中心, 吉林长春 130021

[摘要] 先天性巨结肠是一种先天性肠道疾病, 又称肠无神经节细胞症。干细胞是具有高度增殖能力和多向分化潜能的细胞群体, 可用于先天性巨结肠病变肠段的移植治疗, 有望修复缺失的肠管神经节细胞。干细胞应用于先天性巨结肠治疗仍处于研究和探索阶段, 但其具有良好的应用前景, 可为先天性巨结肠患者提供新的治疗选择。本文主要就干细胞治疗先天性巨结肠的研究进展进行阐述。

[关键词] 先天性巨结肠; 肠神经系统; 移植; 干细胞; 干细胞治疗

[中图分类号] R726.5

[文献标识码] A

[DOI] 10.3969/j.issn.1673-9701.2025.02.032

先天性巨结肠为常见的小儿消化道畸形之一, 全球每 5000 个活产婴儿中便有 1 例先天性巨结肠患儿^[1]。根据病变肠管的长度和累及范围, 将先天性巨结肠分为常见型、短段型、长段型、全结肠型和全肠型。男女患病比例与病变类型有关, 短段型先天性巨结肠男性发病率为女性的 4~5 倍, 长段型先天性巨结肠男性发病率为女性的 1~2 倍, 多呈散发性且有家族性发生倾向^[2]。先天性巨结肠的主要病理特点为病变肠段的肌间神经丛和黏膜下神经丛内的神经节细胞完全缺失^[3]。解剖见受累肠段有明显的狭窄段和扩张段, 肠管表面失去光泽且无法正常蠕动, 造成功能性肠梗阻。患者首发症状多在新生儿期, 表现为胎粪排出延迟, 伴腹胀及呕吐。手术切除病变肠段是当前治疗先天性巨结肠的主要方式。随着腹腔镜和机器人辅助手术的不断发展和完善, 先天性巨结肠手术效果和安全性明显提高, 但术后小肠结肠炎、污粪、便秘、吻合口瘘等合并症仍有较高发生率, 严重影响患儿的生长发育, 降低其生活质量^[4-5]。此外, 全结肠型和全肠型先天性巨结肠患儿的肠道病变范围广, 治疗难度相对较大。近年来, 干细胞因其强大的自我更新和多向分化能力受到广泛关注^[6]。科学家拟通过干细胞移植弥补先天性巨结肠患者肠道中缺失的神经节细胞, 恢复肠道正常生理功能。

1 先天性巨结肠发病与肠神经系统的关系

肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 作为人体内的独立神经系统, 对肠道蠕动、分泌和吸收功能起重要调控作用。ENS 由肠壁神经元和神经胶质细胞组成^[7]。这些细胞大都来源于迷走神经嵴神经腹外侧的迁移, 少部分来自于骶神经嵴^[8]。先天性巨结肠是一种因 ENS 发育异常导致的先天性疾病。在治疗先天性巨结肠时, 除考虑缓解症状外, 还应考

虑如何恢复或重建 ENS 的正常功能。神经嵴细胞 (neural crest cell, NCC) 是胚胎发育早期形成的细胞, 是能迁移并分化成 ENS 的细胞。通过诱导干细胞形成 NCC 并将其移植到患者体内, 可促进 ENS 再生治疗先天性巨结肠^[9]。Schlieve 等^[10]培育出一全功能 ENS 模型, 为肠道疾病的研究开辟新道路。研究表明从先天性巨结肠患儿常规内窥镜检查中采集黏膜活检标本, 进而获取 ENS 干细胞, 这一做法提示未来可使用患者来源的细胞进行自体细胞替代治疗, 可减少伦理和免疫排斥等问题^[11]。

2 干细胞相关研究

干细胞可通过细胞分裂产生与母细胞相同的细胞, 并产生至少一种类型的高度分化子代细胞^[12]。这不仅保证干细胞群体的稳定, 还可为组织的发育和修复提供种子细胞来源。干细胞的来源主要有胚胎组织、胎儿组织、成体组织及经过基因重编程的分化体细胞^[13]。根据分化潜能高低, 干细胞可分为全能干细胞 (totipotent stem cell, TSC)、多能干细胞 (pluripotent stem cell, PSC)、专能干细胞等^[14]。TSC 既具有分化成组成机体所有细胞类型的能力, 又具有分化成胚胎发育时期胚外组织中所有细胞类型的潜能^[15]。只有来自受精卵和二细胞阶段的卵裂球才是真正的 TSC, 因为其能在植入子宫后完成整个发育过程并形成完整个体^[16]。Macfarlan 等^[17]开创性发现胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 中有一小部分细胞表达全能性基因 (MERVL、Zscan4), 但根据 TSC 评估标准, 目前还未获得真正达到全能状态或代替全能状态的干细胞^[18]。PSC 具有分化成组织或器官中多种细胞类型的能力, 但其不具备分化成滋养层来源所有细胞类型的能力。PSC 包括 ESC 和诱导多能干细胞。专能干细胞是一类能够分化成

通信作者: 栾志勇, 电子信箱: 365203849@qq.com

多种细胞类型的干细胞，通常只能分化成特定谱系细胞，包括神经干细胞（neural stem cell, NSC）和造血干细胞等。

3 PSC 治疗先天性巨结肠

Fattahi 等^[19]从人多能干细胞（human pluripotent stem cell, hPSC）中衍生和分离 ENS 祖细胞，并进一步诱导这些祖细胞分化为肠神经嵴衍生细胞和功能性肠神经元，随后将其移植到先天性巨结肠小鼠盲肠肌层中，观察 ENS 的变化。结果发现这些细胞在小鼠肠道中广泛定植，可改善小鼠的肠道运动功能。该研究不仅建立了第 1 个关于人 ENS 发展的研究平台，还揭示了基于细胞治疗先天性巨结肠的前景。但该研究团队尚未明确具体的作用机制，且移植细胞的功能也没有得到证实。Fan 等^[9]将 hPSC 来源的迷走神经嵴细胞和骶骨神经嵴细胞注射到敲除 EDNRB 的 KO 小鼠盲肠中，发现这些细胞不仅表现出较强的迁移能力，还可在肠道环境中分化为 ENS 细胞，揭示 hPSC 来源的 NCC 在 ENS 中具有重要作用。Frith 等^[20]发现在体外培养条件下，使用维甲酸可加速 NCC 分化为 ENS 祖细胞并定植于肠道内，这不仅优化 hPSC 的来源，还对人们理解 ENS 发育及治疗肠道神经相关疾病有重要意义。

ESC 是从内细胞团中提取培养获得的细胞系，其可分化成外胚层、中胚层及内胚层细胞，并能产生肠神经元^[17,21-22]。ESC 在疾病治疗领域应用潜力巨大，但其获取需破坏早期胚胎，这引起伦理争议。因此，科学家希望找到一种可避免使用胚胎的方式获取 ESC 或类似 iPSC，而具有 ESC 特性的极小胚胎样干细胞是一个值得考虑的选择^[23]。2006 年，Takahashi 等^[24]首次使用逆转录病毒将 c-Myc 等 4 个转录因子导入成纤维细胞并成功将其重编程为具有类似 ESC 特性的细胞，称作 iPSC。iPSC 可在保留宿主基因的同时维持干细胞的多能状态^[25]。Lai 等^[26]提取患者皮肤成纤维细胞来源的 iPSC，使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，纠正先天性巨结肠相关基因突变，恢复患者肠神经嵴细胞（enteric neural crest cell, ENCC）的功能。目前科研人员对 PSC 进行大量研究并初见成果。人胚胎干细胞衍生细胞已用于多种疾病的临床治疗研究^[27-29]。

4 专能干细胞治疗先天性巨结肠

Micci 等^[30]从转基因胚胎小鼠的中枢神经系统中成功分离出 NSC，并将这些细胞移植到缺乏神经

元型一氧化氮合酶（neuronal nitric oxide synthase, nNOS）小鼠胃幽门部；结果显示移植的 NSC 不仅能在胃内存活，还能表达 nNOS 并合成一氧化氮，恢复胃肠道正常功能。另一研究也证明将中枢神经系统来源的 NSC 移植到无神经节细胞的大鼠直肠肌层中，可产生表达 nNOS 和胆碱乙酰转移酶的神经元和神经胶质细胞，进而形成新的神经网络，缓解大鼠肠道运动障碍^[31]。虽然 NSC 在改善肠道运动功能方面的潜力在动物实验中得到初步证实，但从中枢神经系统获取 NSC 的方法受到伦理限制。因此，是否能利用 iPSC 分化为 NSC 值得商榷。

肠神经干细胞（enteric neural stem cell, ENSC）起源于神经嵴，主要位于成体肠道肌层中，通过迷走神经嵴在胚胎早期迁移至肠道，发育形成 ENS。Hotta 等^[32]获取正常小鼠的 ENSC，并将其移植到 nNOS^{-/-}小鼠（敲除 nNOS 基因）结肠中，发现移植的 ENSC 与小鼠肠道平滑肌细胞形成功能性连接。ENSC 可直接来源于神经组织，也可由间充质干细胞诱导分化而来。Stavely 等^[33]研究发现，ENSC 和肠间充质细胞可共同促进 ENS 的正常发育，肠间充质细胞分泌的信号分子可模拟肠道微环境，促进 ENSC 的扩增和分化。以上实验表明移植后的 ENSC 可迁移并整合到受损肠道组织中，与周围细胞和组织建立联系，在治疗先天性巨结肠方面有巨大潜力。

个体发育过程中，NCC 通过迷走神经嵴进入近端胃肠道后分化为 ENCC，在胚胎第 4~7 周沿整个胃肠道以远端定向迁移形成 ENS^[34]。Nishikawa 等^[35]从转基因小鼠中获取 ENCC 并将其移植到 Ret^{-/-}小鼠（先天性巨结肠动物模型）的肠壁中，发现移植的 ENCC 能在小鼠无神经节细胞的肠段分化成肠神经元。肠神经元的形成对 ENS 维持正常功能至关重要。Cooper 等^[36]将胎儿结肠 ENCC 移植到先天性巨结肠小鼠中，证明胎儿来源的 ENCC 能分化为适合小鼠 ENS 的神经元和胶质细胞，但只有 53.3% 的小鼠移植成功，比小鼠来源的 ENCC 体内移植 90.3% 的成功率低，推测主要原因是人样本的固有变异^[37]。值得注意的是，动物模型并不能完全展现人 ENS 的复杂性，在 ENCC 用于临床治疗前还需进一步的实验和研究。Nakazawa-Tanaka 等^[38]不仅证明 ENCC 能迁移和定植到小鼠神经节受损肠道中，还发现肠道微环境影响移植后的 ENCC 行为。肠道微环境的失衡被视为诱发先天性巨结肠的一个重要因素^[39]。干细胞治疗与改善微环境相结合的综合治疗模式可能是一个很好的方向^[40]。

5 未来面临的问题和挑战

关于使用何种干细胞治疗先天性巨结肠的问题,ESC 虽然展现出潜在的治疗价值,但在实际应用中仍存在挑战。首先,ESC 的使用受到伦理、致癌性及免疫排斥等诸多因素限制^[41-42]。iPSC 的出现规避了 ESC 伦理争议和排斥反应风险,但新的问题也逐渐浮现出来。获取 iPSC 使用的编程因子 c-Myc 本身是原癌基因,研究人员尝试让 c-Myc 消失、沉默或从细胞中剔除,但这些操作同时可降低重组效率,且被沉默的 c-Myc 也可能被重新激活。尽管研究人员努力提高 iPSC 的纯度和安全性,但仍难以完全消除其致癌风险^[43]。其次,进行干细胞移植过程中可能发生免疫排斥反应,患者将接受长期免疫抑制剂治疗,这会增加其感染和患癌风险。在干细胞治疗实现临床转化前,有必要在移植细胞的获益与长期使用免疫抑制剂的不良反应之间权衡利弊。最后,从何获取干细胞作为可靠来源、干细胞治疗使用的剂量、细胞移植存活和递送率都是需要认真考虑的问题。相信随着先天性巨结肠致病机制的深入剖析和再生医学在干细胞领域的研究,未来会有更好的干细胞来源和更安全的移植方案,为干细胞治疗先天性巨结肠带来创新性改变。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] KLEIN M, VARGA I. Hirschsprung's disease-recent understanding of embryonic aspects, etiopathogenesis and future treatment avenues[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(11): 611.
- [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] MONTALVA L, CHENG L S, KAPUR R, et al. Hirschsprung disease[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2023, 9(1): 54.
- [4] ZHANG S, CAI D, ZHANG Y, et al. Comparison of robotic-assisted surgery and laparoscopic-assisted surgery in children with Hirschsprung's disease: A single-centered retrospective study[J]. *BMC Surg*, 2023, 23(1): 294.
- [5] LI W, LIN M, HU H, et al. Surgical management of Hirschsprung's disease: A comparative study between conventional laparoscopic surgery, transumbilical single-site laparoscopic surgery, and robotic surgery[J]. *Front Surg*, 2022, 9: 924850.
- [6] DALEY G Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1680): 20140376.
- [7] SHARKEY K A, MAWE G M. The enteric nervous system[J]. *Physiological Reviews*, 2023, 103(2): 1487-1564.
- [8] MUELLER J L, GOLDSTEIN A M. The science of Hirschsprung disease: What we know and where we are headed[J]. *Semin Pediatr Surg*, 2022, 31(2): 151157.
- [9] 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.
- [10] SCHLIEVE C R, FOWLER K L, THORNTON M, et al. Neural crest cell implantation restores enteric nervous system function and alters the gastrointestinal transcriptome in human tissue-engineered small intestine[J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 9(3): 883-896.
- [11] MARCO M, CLAIRE C, AMANDA J B, et al. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(7): 2214-2225.
- [12] KOLIOS G, MOODLEY Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine[J]. *Respiration*, 2013, 85(1): 3-10.
- [13] BACAKOVA L, ZARUBOVA J, TRAVNICKOVA M, et al. Stem cells: Their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - A review[J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1111-1126.
- [14] BOZDAĞ S C, YÜKSEL M K, DEMIRER T. Adult stem cells and medicine[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1079: 17-36.
- [15] CAI J, CHEN H, XIE S, et al. Research progress of totipotent stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2022, 31(13-14): 335-345.
- [16] HU Y, YANG Y, TAN P, et al. Induction of mouse totipotent stem cells by a defined chemical cocktail[J]. *Nature*, 2023, 617(7962): 792-797.
- [17] MACFARLAN T S, GIFFORD W D, DRISCOLL S, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity[J]. *Nature*, 2012, 487(7405): 57-63.
- [18] POSFAI E, SCHELL J P, JANISZEWSKI A, et al. Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency[J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(1): 49-60.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] WEATHERBEE B A T, CUI T, ZERNICKA-GOETZ M. Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells[J]. Dev Biol, 2021, 474: 91–99.
- [22] PEDROZA M, GASSALOGU S I, DIAS N, et al. Self-patterning of human stem cells into post-implantation lineages[J]. Nature, 2023, 622(7983): 574–583.
- [23] RATAJCZAK M Z, RATAJCZAK J, KUCIA M. Very small embryonic-like stem cells (VSELs)[J]. Circ Res, 2019, 124(2): 208–210.
- [24] 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.
- [25] LIU G, DAVID B T, TRAWCZYNSKI M, et al. Advances in pluripotent stem cells: History, mechanisms, technologies, and applications[J]. Stem Cell Rev Rep, 2020, 16(1): 3–32.
- [26] 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.
- [27] SCHWARTZ S D, REGILLO C D, LAM B L, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies[J]. Lancet, 2015, 385(9967): 509–516.
- [28] PIAO J, ZABIEROWSKI S, DUBOSE B N, et al. Preclinical efficacy and safety of a human embryonic stem cell-derived midbrain dopamine progenitor product, MSK-DA01[J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(2): 217–229.
- [29] SHIN J H, RYU C M, YU H Y, et al. Safety of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells for treating interstitial cystitis: A phase I study[J]. Stem Cells Transl Med, 2022, 11(10): 1010–1020.
- [30] MICCI M A, KAHRIG K M, SIMMONS R S, et al. Neural stem cell transplantation in the stomach rescues gastric function in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice[J]. Gastroenterology, 2005, 129(6): 1817–1824.
- [31] DONG Y L, LIU W, GAO Y M, et al. Neural stem cell transplantation rescues rectum function in the aganglionic rat[J]. Transplant Proc, 2008, 40(10): 3646–3652.
- [32] HOTTA R, RAHMAN A, BHAVE S, et al. Transplanted ENSCs form functional connections with intestinal smooth muscle and restore colonic motility in nNOS-deficient mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2023, 14(1): 232.
- [33] STAVELY R, BHAVE S, HO W L N, et al. Enteric mesenchymal cells support the growth of postnatal enteric neural stem cells[J]. Stem Cells, 2021, 39(9): 1236–1252.
- [34] 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.
- [35] NISHIKAWA R, HOTTA R, SHIMOJIMA N, et al. Migration and differentiation of transplanted enteric neural crest-derived cells in murine model of Hirschsprung's disease[J]. Cytotechnology, 2015, 67(4): 661–670.
- [36] 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.
- [37] COOPER J E, MCCANN C J, NATARAJAN D, et al. In vivo transplantation of enteric neural crest cells into mouse gut; engraftment, functional integration and long-term safety[J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0147989.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] VICENTINI F A, KEENAN C M, WALLACE L E, et al. Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 210.
- [41] WANG H, GONG P, LI J, et al. Role of CD133 in human embryonic stem cell proliferation and teratoma formation[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 208.
- [42] GOLCHIN A, CHATZIPARASIDOU A, RANJBARVAN P, et al. Embryonic stem cells in clinical trials: Current overview of developments and challenges[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1312: 19–37.
- [43] YOSHIHARA M, OGUCHI A, MURAKAWA Y. Genomic instability of iPSCs and challenges in their clinical applications[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1201: 23–47.

(收稿日期: 2024-09-27)

(修回日期: 2024-11-20)