

· 综述 ·

先天性巨结肠干细胞治疗的研究进展



全文二维码

曲志博 马达

广东省东莞市儿童医院小儿外科, 东莞 523325

通信作者: 马达, Email: 804103064@qq.com

【摘要】 干细胞治疗已在器官修复和组织再生领域发挥重要作用,特别是对某些重大疾病及临床上疑难杂症的治疗和缓解具有重要意义,有较为广阔的应用前景。本文就干细胞治疗先天性巨结肠的可行性与研究进展进行综述。

【关键词】 干细胞; 治疗; Hirschsprung 病; 胚胎发育; 研究

基金项目: 东莞市社会发展重点项目 (201950715028167; 20221800905372; 20231800939942)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202308039-019

Recent advances of stem cell therapy for Hirschsprung's disease

Qu Zhibo, Ma Da

Department of Pediatric General Surgery, Municipal Children's Hospital, Dongguan 523325, China

Corresponding author: Ma Da, Email: 804103064@qq.com

【Abstract】 Playing a vital role in the field of organ repair and tissue regeneration, stem cell therapy is indicated for the treatment and remission of some major diseases and difficult diseases. It has a broad range of application prospects. This review summarized the latest researches of stem cell therapy for Hirschsprung's disease.

【Key words】 Stem Cells; Therapy; Hirschsprung Disease; Embryonic Development; Research

Fund program: Dongguan Municipal Key Project of Social Development (201950715028167; 20221800905372; 20231800939942)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202308039-019

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HSCR) 是小儿外科常见病,其发病率约为 1/5 000,在婴幼儿中仅次于肛门直肠畸形,位列先天消化道畸形第二位;男性发病率为女性的 3~4 倍,多呈散发性,3.8%~8.0% 的病例有家族遗传史,表现为常染色体显性或隐性遗传^[1]。HSCR 的主要病因是肠神经系统发育缺陷 (即肠肌间神经丛中神经节细胞缺如),又称为肠无神经节细胞症,其病理生理基础是各种因素致胚胎期神经嵴细胞在消化道移行受阻,导致病变肠管神经发育异常,表现为神经节细胞无法发育或发育停止,造成病变处肠管痉挛狭窄,近端肠管代偿性扩大,形成巨结肠。目前越来越多的证据表明 HSCR 实际上是一种先天性后肠发育异常,其肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 形成受阻,继而导致肠梗阻^[2]。HSCR 患儿通常因出生后早期胎粪排出延迟致新生儿肠梗阻而被诊断,也可表现婴幼儿时期慢性便秘。目前手术是治疗 HSCR 的主要手段,包括 Soave、Swenson、Duhamel 在内的各种经典巨结肠手术,目的在于切除病变肠管,恢复肠神经的连续性,重建肠道排便功能^[3]。近年来随着腹腔镜微创技术的迅速发展, HSCR 的手术效果得到了进一步提高,但依然存在手术并发症较多的问题,尤其是

术后中远期小肠结肠炎、粪便污染和顽固性便秘等,可导致部分患者预后不佳^[4]。此外,全结肠型巨结肠患儿仍缺乏更为有效的治疗手段,因此,寻求一种新的、更为有效的替代治疗显得尤为重要。近年来,干细胞治疗在肿瘤治疗、器官修复、免疫缺陷等方面的应用引起了广大学者的密切关注,不仅高效、安全,而且在维持细胞生物学功能以及改善临床预后等方面具有较为显著的优势。有研究表明,干细胞治疗可以促进 HSCR 病变肠管神经恢复并再生,进而达到根治的目的^[5]。本文就干细胞治疗 HSCR 的研究进展进行综述。

一、HSCR 的病理生理改变

HSCR 是一种神经嵴细胞 (neural crest cell, NCC) 源性疾病,涉及单基因或多基因突变。从胚胎发育第 4 周开始, NCC 从神经管沿胃肠道轴由头侧向尾侧迁移、增殖、分化,最终形成 ENS 系统^[6]。该系统包括复杂的神经元和神经胶质网络,负责肠道肌肉蠕动和肠液分泌等。在迁移过程中,一些尚未分化或尚未发育成熟的 NCC 最终发育为成熟的 NCC 并形成 ENS 系统,此类 NCC 称为肠型 NCC 或肠型干细胞 (enteric neural crest cell, ENCC), 又被称为肠神经系统源性多能祖细胞 (enteric nervous system derived multipotential pro-

genitor cell, ENSPC)^[7]。无论何种原因造成 ENCC 移行障碍,或局部微环境改变导致 ENCC 增殖、分化、成熟异常或神经嵴细胞凋亡,均可导致 HSCR 发生。在某种程度上,这些动态机制可以通过 NCC 和肠道中胚层之间的信号通路相互作用,能明确控制 ENS 发展的关键信号系统,包括 GDNF/RET 和 ET3/EDNRB 通路^[8]。GDNF/RET 信号系统由肠道中胚层分泌的胶质细胞源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)组成,与 ENCC 中存在的酪氨酸激酶 RET 受体和 GDNF 家族受体 $\alpha 1$ (GDNF family receptor $\alpha 1$, GFR $\alpha 1$) 受体相互作用,在 ENCC 向远端迁移的趋化过程中发挥重要作用^[9]。此外, GFR $\alpha 1$ 作为有丝分裂因子促进增殖,以确保形成充足的 ENCC^[10]; ET3/EDNRB 通路由肠道中胚层分泌的内皮素-3 (endothelin-3, ET3) 组成,其与 ENCC 中的 EDNRB 蛋白结合,该信号通路用于维持 ENCC 细胞处于未分化状态,使其能够迁移并完全定植于肠道^[11]。目前已明确, HSCR 的主要致病原因是后肠末端无法形成适当的 ENS 系统,导致大便阻塞甚至无法排出。这种缺陷通常是由负责 ENCC 迁移、增殖和分化途径中的某些遗传缺陷所引起^[12-13]。

迄今为止,在 HSCR 中已经确定存在 21 个基因突变,这些基因编码均参与了 NCC 功能的形成和 ENS 发育的蛋白质功能合成^[14]。RET 原癌基因被发现是该疾病表型的主要影响因素,超过 200 个 RET 功能突变与约 20% 的散发型和多达 50% 的家族型 HSCR 相关^[15-16]。RET 突变的 HSCR 外显率和表型变异性的降低部分归因于 RET 基因内特定的单核苷酸多态性修饰因子^[17]。RET 突变的 HSCR 是显性遗传,具有不完全外显性,与 MEN2A 综合征有关,而 GDNF 突变的 HSCR 是非孟德尔型和非综合征型^[15]。此外,由此产生的表型可以通过并发突变来解释,如 EDNRB 基因被证明与 RET 具有上位性相互作用^[18]。同时,研究者们对表观遗传修饰的 ENS 发育和 HSCR 发病机制进行了大量基础研究,如 DNMT3B 下调通过 DNA 甲基化模式改变导致其表型严重突变,其他表观遗传修饰涉及不同位点的 NCC 发育和功能,包括组蛋白修饰、多梳抑制、染色质重塑和非编码 RNA,这些调节机制进一步解释了 HSCR 的病理生理过程^[19]。上述包括 HSCR 表观遗传学在内的病理生理改变有助于我们进一步理解 HSCR 的发病原因及机制,同时为寻找 HSCR 治疗的新途径提供了思路。

二、HSCR 治疗现状

目前 HSCR 的主要治疗方法是切除病变肠管,并将具有正常功能的结肠末端与肛门吻合,以恢复肠神经的连续性。手术治疗的目的是缓解梗阻的同时保持正常排便功能。HSCR 手术治疗有多种方式,包括 Soave 术、Sweason 术、Duhamel 术在内的各种经典巨结肠手术。特别是近年来腹腔镜微创技术的迅速发展,这些手术均可在腹腔镜辅助下经肛门进行,但手术方式的选择主要取决于外科医师的偏好和 HSCR 的病理分型。尽管总体治疗成功率已很高,目前死亡率控制在 5% 以下,但并发症的发生率仍然较高,尤其是术后

中远期小肠结肠炎、粪便污染和慢性便秘等,导致部分患者预后不佳^[5]。据不完全统计,术后中远期便秘的发生率为 24%,污粪发生率为 21%,小肠结肠炎发生率超过 30%,特别是部分患者术后出现肛门功能受损从而导致严重便秘,这对患者心理造成了毁灭性的影响^[3-4]。据文献报道,仍有 43%~48% 的 HSCR 患者需要接受后续额外的治疗^[20]。

三、HSCR 的干细胞治疗

干细胞治疗为 HSCR 的 ENS 功能障碍问题提供了基于细胞治疗的解决方案,不仅避免了常规手术治疗导致的后遗症,而且从根本上恢复了 ENS 的生理发育和功能,其治疗原理是利用 ENCC 的增殖潜力重建功能性 ENS,达到治疗、康复的目的。

根据分化发育潜能,干细胞可分为全能干细胞、多能干细胞以及单能干细胞;全能干细胞可以分化形成完整的个体,如胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC);多能干细胞具有分化成几乎所有细胞类型的能力,如造血干细胞、生殖干细胞、间充质干细胞、神经干细胞等;在多能干细胞的基础上,科学家将人体分化成熟的功能细胞(如皮肤细胞和血液细胞)通过基因转染使其逆转为原始的全能干细胞,称为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC);而单能干细胞是指具有向一种或两种相关的细胞类型分化潜能,如肌肉中的成肌细胞、上皮组织基底的干细胞等。根据干细胞所处发育阶段,又可分为胚胎干细胞和成体干细胞,其中成体干细胞来源于成体的许多组织和器官,都具备修复和再生的能力。在特定条件下,成体干细胞可产生新的干细胞,或按一定程序分化形成新的功能细胞,从而使组织和器官保持生长与衰退的动态平衡^[21]。

最新研究表明, HSCR 的干细胞治疗可以根据 ENCC 的来源进行分类,目前研究热点在以下干细胞种类: iPSC、ESC 以及自体 ENCC 细胞移植^[22]。国外学者已在尝试通过 iPSC 衍生的 ENCC 植入方法,从 HSCR 患者身上提取成体细胞(如皮肤成纤维细胞),并将其重新编程为 iPSC,在体外培养并进行校正以排除相关突变,分化成为良好的 ENCC,最后将修饰的 ENCC 植入病变节段。这种方法的一个显著优点是可以获得任何体细胞作为来源,并将其重新编程以遵循自身的 ENS 谱系;另一种类似的方法是植入 iPSC 衍生的 ENCC,不纠正相关的突变但可以大大缩短增殖分化的时间。Lai 等^[23]从 HSCR 患者中生成了 iPSC 衍生的 ENCC 细胞系,并利用 CRISPR/Cas9 纠正了潜在的 Ret 突变,进一步证明了基因校正后 ENCC 在体外的迁移和分化能力恢复。而另一组研究人员开发了一种增强 ENCC 的分化方案,不进行纠正修饰,可明显缩短 ENCC 增殖分化的时间间隔^[24]。而对于 ESC 衍生的 ENCC,由于其干细胞来源将是健康的人类着床前胚胎的内部细胞,因此治疗步骤将只包括分化和直接移植,无需进行突变纠正和修饰。Fattahi 等^[25]于 2016 年建立了 ESC 衍生 ENCC 细胞系及其特定的神经元亚型,旨在为 HSCR 细胞治疗提供药物测试平台和工具。将 ESC 衍生的 ENCC 局部移植到 HSCR 小鼠模型的结肠中,证明了该方法的治疗潜

能,成功率达 100%。然而,其具体机制尚不明确,此类方法同时受到其动物模型显著自发存活的干扰^[26]。还有一种方法是自体 ENCC 移植,这种方法可从患者结肠中获得肠道组织以分离 ENCC,在体外扩增细胞并将其移植回患者体内,用以纠正 HSCR 突变。该方法需要通过内窥镜获得 ENCC 细胞,并通过特定的流式细胞术标记,然后进行分离^[27-28]。与 iPSC 驱动的 ENCC 方法类似,理论上我们可以在没有突变修复的情况下进行植入。然而,由于出生后 ENCC 的自我更新能力有限,可能需要体外增殖以及预防突变的修饰方案^[29]。ENCC 自身植入的概念包含了几个已被研究的组成部分,即解剖植入、功能整合、覆盖范围以及与宿主肠道的相互作用,其已在野生型小鼠中成功移植^[30-31]。2016 年,Cooper 等^[32]研究了将 HSCR 小鼠自体 ENCC 细胞移植到自身体内,免疫组织化学显示约 90.3% 的小鼠在一定局部范围内形成和定植神经细胞和神经胶质。通过钙荧光成像证实了其神经功能整合,对内源性神经施加电刺激,并从移植细胞记录到神经反应,证实其整合成功。在安全性方面,随访 2 年未发现肿瘤形成。这一结果与 McCann 等^[33]将小鼠 ENCC 移植到神经元型一氧化氮合酶缺陷小鼠 HSCR 模型的研究结果一致。为了探索人类 ENCC 作为移植细胞来源的潜力,Cooper 等^[34]将人类胎儿 ENCC 细胞移植到免疫缺陷 HSCR 小鼠模型中,其中约 50% 的小鼠移植成功,分化神经元的轴突突起延伸超过 (1.2 ± 0.6) mm,并将这种有限的植入归因于人类样本的固有变异性。与小鼠 ENCC 细胞相比,人类 ENCC 细胞体外增殖和形成神经球样体的稳健性降低。因此我们认为,这种限制也受到物种生态差异的影响。

以上干细胞治疗 HSCR 的不确定因素主要与细胞来源和细胞突变修复相关。无论是通过 ESC 细胞还是 iPSC 细胞衍生,都存在发生肿瘤的潜在风险^[35-36]。而这种风险可通过使用单克隆抗体,在移植前选择性灭活未分化的细胞,从而使危害最小化。此外,针对潜在肿瘤形成的移植后安全措施包括使用自杀基因^[37]。该解决方案涉及在移植前用凋亡诱导基因转染干细胞,如编码 Caspase-9 酶的 CASP9,该基因将在使用诱导剂后被激活。当使用 ESC 或 iPSC 诱导的 ENCC 发生严重不良反应时,这种安全措施将是防止其肿瘤化的最后手段^[38]。除了发生肿瘤的风险外,使用 ESC 衍生的 ENCC 进行同种异体移植还需要终身使用免疫抑制剂,以减少排斥反应和移植物抗宿主病,但这会诱发 HSCR 相关的、反复发生的、可能致命的小肠结肠炎^[22]。综上,目前更倾向于自体 ENCC 来源的干细胞移植,其次为 iPSC 衍生的 ENCC 植入。

目前,在短段型 HSCR 的患者中,ENCC 的自体移植治疗已经进入了临床试验阶段,Burns 等^[39]证明,从 HSCR 患者中分离的 ENCC 能够从体外移植到自体神经节段中,但其临床效果有待进一步观察。Burns 等^[40]将人自体 ENCC 移植到 HSCR 患者相应神经节段,但由于受体肠道被切成 1 ~ 2 mm³ 的碎片,因此很难评估供体细胞重建的情况。此外,对于移植细胞与新宿主肠道微环境之间潜在的异常相互作用,以及是否会导致移植后建立一个与宿主 ENS 竞争的新

的功能网络,目前知之甚少。或许通过使用单细胞 RNA 测序,可以在更精确的水平上检查移植后细胞的功能水平^[41]。

而对于基因突变的修复,可以通过基因编辑或基因添加等修饰方法来控制。上面提到的 CRISPR/Cas9 基因编辑平台因其多功能性和相对易用性,被广泛应用于生物医学研究^[42]。然而,由于切割后 DNA 修复存在多种可能结果,且容易产生脱靶效应,该系统同样存在不可预知的风险。研究者进一步通过使用替代的新型 CRISPR 核酸酶来降低其风险,例如由 Anzalone 等^[43]开发的 prime 编辑系统,该系统通过利用催化受损的 Cas9 内切酶与工程逆转录酶融合,以替代所需的 DNA 碱基,该逆转录酶可以用引物编辑指导 RNA 编程。与 CRISPR/Cas9 不同,这种设计绕过了双链断裂的需要,同时不需要 DNA 模板。对于基因添加修饰,其目的是通过载体向 ENCC 提供与 HSCR 相关的功能基因产物(如 *RET* 基因)。尽管病毒载体的使用普遍且高效,但根据病毒载体类别的不同,同样存在不同程度的插入突变风险^[44]。例如,伽玛逆转录病毒载体治疗 X 连锁严重联合免疫缺陷患者被证明具有显著的插入突变风险,导致原癌基因激活和 T 细胞白血病的发生^[45]。基于对更安全载体的进一步追求,科学家发现了自灭活慢病毒载体(self-inactivating, SIN)。从安全性角度来看,将这类载体作为 HSCR 中基因添加的候选物主要有两个主要原因。首先,SIN 慢病毒载体具有获批临床应用的优点,它是在细胞免疫疗法 kymtiah 的基础上产生的,kymtiah 又称为替沙来塞,是 FDA 批准的首个用于急性淋巴细胞白血病的基因疗法^[46]。其次,已有文献报道 SIN 慢病毒载体被用于转染人 ENCC 细胞。2014 年,Natarajan 等^[47]验证了采用 SIN 慢病毒载体标记人类结肠活检获得的 ENS 干细胞荧光报告基因方案的可行性,将这些细胞移植到免疫缺陷受体小鼠的结肠后,显示约 90% 的转导效率,并在移植后 2 个月内保持稳定。

如前所述,HSCR 是一种可能涉及多基因参与的复杂疾病,这对 iPSC 诱导的 ENCC 和自体方法的基因治疗构成了非常大的障碍。要承担修复 HSCR 的突变,我们将面临要么是单一突变,要么是多发突变,或不同基因内多个不同突变。对于单基因突变,基因编辑(如通过 CRISPR/Cas9)或基因添加方法(如通过病毒载体传递)是可行的。但如果是多基因参与,基因治疗将存在较大的困难。

四、HSCR 干细胞治疗的移植方式

HSCR 干细胞的移植方式(即细胞输送的方式)目前有两个方面需要考虑。首先,是否存在一个最佳的组织学给药位置,从而保证理想的治疗效果;其次,哪种移植技术更适合在人体中使用。既往通过剖腹手术直接注射细胞悬浮液或神经球样体的动物模型研究,初步证据表明肠道肌肉注射和浆膜下注射优于腹膜途径^[48]。Cheng 等^[49]提出将内窥镜作为一种安全可靠的给药方法,在小鼠中成功植入,无并发症发生。内窥镜给药的潜力可以通过在大型动物模型上进行测试来进一步研究^[50]。

五、HSCR 干细胞治疗的伦理思考

关于 HSCR 的伦理思考,首先,在 ENCC 的细胞来源中,ESC 的使用是非常有争议的,尤其在海外。因此,iPSC 是一种在道德或伦理上更容易接受的替代方案^[51]。其次,伦理考虑是在进行临床试验之前评估风险-收益比,目前在患有 HSCR 的情况下,患者均接受手术治疗,总体预期满意,所以是否有必要继续进行人体干细胞治疗试验,还是将干细胞治疗作为 HSCR 常规治疗的辅助手段,值得我们思考并解决^[52-53]。

综上,我们着重阐述了 HSCR 发病机制以及干细胞治疗的研究进展,以寻求一种新的突破性治疗方式。相信随着 ENS 系统在 HSCR 发病机制中所起作用的研究进一步深入,干细胞治疗 HSCR 的作用机制和临床价值将日益凸显,干细胞治疗有望给 HSCR 治疗理念带来根本性的变化。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 翟威,刘远梅. 神经嵴细胞迁移障碍在先天性巨结肠发病中的作用研究进展[J]. 中华小儿外科杂志,2023,44(1):87-91. DOI:10.3760/cma.j.cn421158-20220711-00485.
Zhai W, Liu YM. Research advances on the role of neural crest cell migration disorder in Hirschsprung's disease[J]. Chin J Pediatr Surg, 2023, 44(1):87-91. DOI:10.3760/cma.j.cn421158-20220711-00485.
- [2] Bradnock TJ, Knight M, Kenny S, et al. Hirschsprung's disease in the UK and Ireland: incidence and anomalies[J]. Arch Dis Child, 2017, 102(8):722-727. DOI:10.1136/archdischild-2016-311872.
- [3] 曾纪晓,徐晓钢. 先天性巨结肠诊疗规范化的再思考[J]. 临床小儿外科杂志,2021,20(3):201-207. DOI:10.12260/lxewkzz.2021.03.001.
Zeng JX, Xu XG. Some focal issues of standardizing the diagnosis and treatment of Hirschsprung's disease[J]. J Clin Ped Sur, 2021, 20(3):201-207. DOI:10.12260/lxewkzz.2021.03.001.
- [4] 李颀,张震,李龙. 先天性巨结肠再次手术的技术和思考[J]. 临床小儿外科杂志,2021,20(3):208-211. DOI:10.12260/lxewkzz.2021.03.002.
Li Q, Zhang Z, Li L. Techniques and considerations of re-operations for Hirschsprung's disease[J]. J Clin Ped Sur, 2021, 20(3):208-211. DOI:10.12260/lxewkzz.2021.03.002.
- [5] 王吉,李智. 先天性巨结肠非手术治疗研究进展[J]. 临床小儿外科杂志,2022,21(2):186-190. DOI:10.3760/cma.j.cn.101785-202104064-016.
Wang J, Li Z. Recent advances of non-surgical treatment of Hirschsprung's disease[J]. J Clin Ped Sur, 2022, 21(2):186-190. DOI:10.3760/cma.j.cn.101785-202104064-016.
- [6] Shellard A, Mayor R. Integrating chemical and mechanical signals in neural crest cell migration[J]. Curr Opin Genet Dev, 2019, 57:16-24. DOI:10.1016/j.gde.2019.06.004.
- [7] Schriemer D, Sribudiani Y, Ijima A, et al. Regulators of gene expression in enteric neural crest cells are putative Hirschsprung disease genes[J]. Dev Biol, 2016, 416(1):255-265. DOI:10.1016/j.ydbio.2016.06.004.
- [8] Gui HS, Schriemer D, Cheng WW, et al. Whole exome sequencing coupled with unbiased functional analysis reveals new Hirschsprung disease genes[J]. Genome Biol, 2017, 18(1):48. DOI:10.1186/s13059-017-1174-6.
- [9] Szabó A, Mayor R. Mechanisms of neural crest migration[J]. Annu Rev Genet, 2018, 52:43-63. DOI:10.1146/annurev-genet-120417-031559.
- [10] Sánchez MP, Silos-Santiago I, Frisén J, et al. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF[J]. Nature, 1996, 382(6586):70-73. DOI:10.1038/382070a0.
- [11] Ji Y, Tam PKH, Tang CSM. Roles of enteric neural stem cell niche and enteric nervous system development in Hirschsprung disease[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(18):9659. DOI:10.3390/ijms22189659.
- [12] Roberto GM, Emery G. Directing with restraint: mechanisms of protrusion restriction in collective cell migrations[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 129:75-81. DOI:10.1016/j.semdb.2022.03.037.
- [13] Heuckeroth RO, Schäfer KH. Gene-environment interactions and the enteric nervous system: neural plasticity and Hirschsprung disease prevention[J]. Dev Biol, 2016, 417(2):188-197. DOI:10.1016/j.ydbio.2016.03.017.
- [14] Alhawaj AF. Stem cell-based therapy for Hirschsprung disease, do we have the guts to treat? [J]. Gene Ther, 2022, 29(10/11):578-587. DOI:10.1038/s41434-021-00268-4.
- [15] Alves MM, Sribudiani Y, Brouwer RWW, et al. Contribution of rare and common variants determine complex diseases-Hirschsprung disease as a model[J]. Dev Biol, 2013, 382(1):320-329. DOI:10.1016/j.ydbio.2013.05.019.
- [16] Tilghman JM, Ling AY, Turner TN, et al. Molecular genetic anatomy and risk profile of Hirschsprung's disease[J]. N Engl J Med, 2019, 380(15):1421-1432. DOI:10.1056/NEJMoa1706594.
- [17] Yang DH, Yang J, Li S, et al. Effects of RET, NRG1 and NRG3 polymorphisms in a Chinese population with Hirschsprung disease[J]. Sci Rep, 2017, 7:43222. DOI:10.1038/srep43222.
- [18] Kim JH, Cheong HS, Sul JH, et al. A genome-wide association study identifies potential susceptibility loci for Hirschsprung disease[J]. PLoS One, 2014, 9(10):e110292. DOI:10.1371/journal.pone.0110292.
- [19] Torroglosa A, Villalba-Benito L, Luzón-Toro B, et al. Epigenetic mechanisms in Hirschsprung disease[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13):3123. DOI:10.3390/ijms20133123.
- [20] Thakkar HS, 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. DOI:10.1016/j.jpedsurg.2016.11.023.
- [21] Burns AJ, Thapar N. Neural stem cell therapies for enteric nervous system disorders[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014, 11(5):317-328. DOI:10.1038/nrgastro.2013.226.
- [22] Obermayr F, Seitz G. Recent developments in cell-based ENS regeneration-a short review[J]. Innov Surg Sci, 2018, 3(2):93-99. DOI:10.1515/iss-2018-0005.
- [23] Lai FPL, Lau ST, Wong JKL, 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. e8. DOI:10.1053/j.gastro.2017.03.014.
- [24] Barber K, Studer L, Fattahi F. Derivation of enteric neuron lineages from human pluripotent stem cells[J]. Nat Protoc, 2019, 14(4):1261-1279. DOI:10.1038/s41596-019-0141-y.
- [25] Fattahi F, Steinbeck JA, Kriks S, et al. Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease[J]. Nature, 2016, 531(7592):105-109. DOI:10.1038/na-

- ture16951.
- [26] Kobayashi GS, Musso CM, de Paula Moreira D, et al. Recapitulation of neural crest specification and EMT via induction from neural plate border-like cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 15 (3) : 776-788. DOI:10.1016/j.stemcr.2020.07.023.
- [27] Zhang A, Aslam H, Sharma N, et al. Conservation of epithelial-to-mesenchymal transition process in neural crest cells and metastatic cancer [J]. *Cells Tissues Organs*, 2021, 210 (3) : 151-172. DOI: 10.1159/000516466.
- [28] Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21 (6) : 341-352. DOI:10.1038/s41580-020-0237-9.
- [29] Piacentino ML, Li YW, Bronner ME. Epithelial-to-mesenchymal transition and different migration strategies as viewed from the neural crest [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2020, 66 : 43-50. DOI: 10.1016/j.ceb.2020.05.001.
- [30] Hotta R, Stamp LA, Foong JPP, et al. Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (3) : 1182-1191. DOI:10.1172/JCI65963.
- [31] Stamp LA, Gwynne RM, Foong JPP, et al. Optogenetic demonstration of functional innervation of mouse colon by neurons derived from transplanted neural cells [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152 (6) : 1407-1418. DOI:10.1053/j.gastro.2017.01.005.
- [32] Cooper JE, McCann CJ, 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. DOI:10.1371/journal.pone.0147989.
- [33] McCann CJ, Cooper JE, Natarajan D, et al. Transplantation of enteric nervous system stem cells rescues nitric oxide synthase deficient mouse colon [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 : 15937. DOI: 10.1038/ncomms15937.
- [34] Cooper JE, Natarajan D, McCann CJ, et al. In vivo transplantation of fetal human gut-derived enteric neural crest cells [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2017, 29 (1) : e12900. DOI:10.1111/nmo.12900.
- [35] Lee AS, Tang C, Rao MS, et al. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies [J]. *Nat Med*, 2013, 19 (8) : 998-1004. DOI:10.1038/nm.3267.
- [36] Prokhorova TA, Harkness LM, Frandsen U, et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18 (1) : 47-54. DOI:10.1089/scd.2007.0266.
- [37] Li WQ, Xiang AP. Safeguarding clinical translation of pluripotent stem cells with suicide genes [J]. *Organogenesis*, 2013, 9 (1) : 34-39. DOI:10.4161/org.24317.
- [38] Itakura G, Kawabata S, Ando M, et al. Fail-safe system against potential tumorigenicity after transplantation of iPSC derivatives [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8 (3) : 673-684. DOI:10.1016/j.stemcr.2017.02.003.
- [39] Rollo BN, Zhang DC, Stamp LA, 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. DOI:10.1016/j.jcmgh.2015.09.007.
- [40] Burns AJ, Goldstein AM, Newgreen DF, et al. White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies [J]. *Dev Biol*, 2016, 417 (2) : 229-251. DOI:10.1016/j.ydbio.2016.04.001.
- [41] McCann CJ, Alves MM, Brosens E, et al. Neuronal development and onset of electrical activity in the human enteric nervous system [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156 (5) : 1483-1495. e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.12.020.
- [42] Yeh CD, Richardson CD, Corn JE. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21 (12) : 1468-1478. DOI:10.1038/s41556-019-0425-z.
- [43] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576 (7785) : 149-157. DOI:10.1038/s41586-019-1711-4.
- [44] Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update [J]. *J Gene Med*, 2018, 20 (5) : e3015. DOI:10.1002/jgm.3015.
- [45] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1 [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (9) : 3132-3142. DOI:10.1172/JCI35700.
- [46] Seimetz D, Heller K, Richter J. Approval of first CAR-Ts: have we solved all hurdles for ATMPs? [J]. *Cell Med*, 2019, 11 : 2155179018822781. DOI:10.1177/2155179018822781.
- [47] Natarajan D, Cooper J, Choudhury S, et al. Lentiviral labeling of mouse and human enteric nervous system stem cells for regenerative medicine studies [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2014, 26 (10) : 1513-1518. DOI:10.1111/nmo.12420.
- [48] Tsai YH, Murakami N, Gariepy CE. Postnatal intestinal engraftment of prospectively selected enteric neural crest stem cells in a rat model of Hirschsprung disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23 (4) : 362-369. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2010.01656.x.
- [49] Cheng LS, Hotta R, Graham HK, et al. Endoscopic delivery of enteric neural stem cells to treat Hirschsprung disease [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27 (10) : 1509-1514. DOI: 10.1111/nmo.12635.
- [50] Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Yamataka A. Animal models of Hirschsprung's disease: state of the art in translating experimental research to the bedside [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2019, 29 (4) : 361-367. DOI:10.1055/s-0039-1694745.
- [51] Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy [J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15 (1) : 36-45. DOI:10.7150/ijms.21666.
- [52] Brosens E, Burns AJ, Brooks AS, et al. Genetics of enteric neuropathies [J]. *Dev Biol*, 2016, 417 (2) : 198-208. DOI:10.1016/j.ydbio.2016.07.008.
- [53] Widyasari A, Pavitasari WA, Dwihantoro A, et al. Functional outcomes in Hirschsprung disease patients after transabdominal Soave and Duhamel procedures [J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18 (1) : 56. DOI:10.1186/s12876-018-0783-1.

(收稿日期:2023-08-28)

本文引用格式: 曲志博, 马达. 先天性巨结肠干细胞治疗的研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2023, 22 (12) : 1197-1201. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202308039-019.

Citing this article as: Qu ZB, Ma D. Recent advances of stem cell therapy for Hirschsprung's disease [J]. *J Clin Pediatr Surg*, 2023, 22 (12) : 1197-1201. DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202308039-019.