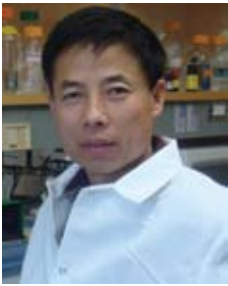


特约综述



用体细胞重编程技术建立病人特异的诱导多能干细胞(iPS细胞)模型对于研究神经遗传发育疾病和神经退行性疾病的发病机理、药物筛选及探讨自体移植治疗具有重要的理论意义和临床应用价值。目前研究发现, DNA表达载体、RNA、蛋白质及一些小分子化合物均能对体细胞进行表观遗传学修饰从而诱导产生iPS细胞。我们实验室的主要研究方向是: (1)帕金森氏病人诱导多能干细胞产生与体细胞重编程; (2)神经遗传病的致病基因克隆与功能分析; (3)建立疾病动物模型, 进行干细胞移植治疗机理研究; (4)干细胞移植治疗神经系统疾病的临床疗效研究。

诱导多能干细胞及其在神经退行性疾病研究中的应用

韩发彬*

(泰山医学院聊城临床学院干细胞与再生医学中心, 山东 252000)

摘要 用干细胞转录因子OCT4、SOX2、c-MYC和KLF4进行体细胞重编程产生具有胚胎干细胞特性的诱导多能干细胞(iPS细胞)是干细胞研究领域的突破性进展。近年来, iPS细胞的研究从产生方法、重编程机理及实际应用方面不断取得进展。由于iPS细胞的产生可取自体细胞, 因而克服了胚胎干细胞应用的伦理学和免疫排斥等缺陷, 为iPS细胞的临床应用开辟了广阔的前景。该文将对iPS细胞的产生方法、重编程机理及其在神经性退行性疾病的研究与应用进行文献综述, 反映近几年iPS细胞最新研究成果, 并阐述了用病人iPS细胞模型探讨帕金森氏病、老年性痴呆症、脊髓侧索硬化症、脊髓肌肉萎缩症及舞蹈症等5种常见神经性退行性疾病发病机理的研究现状。

关键词 诱导多能干细胞; 体细胞重编程; 神经性退行性疾病

1 概述

用体细胞重编程产生具有胚胎干细胞功能的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)是医学与生物学史上具有划时代意义的里程碑。2006年, 日本的Yamanaka等^[1]首先用4个干细胞转录因子OCT4、SOX2、KLF4和c-MYC, 通过体细胞重编程将小鼠成纤维细胞转化成具有胚胎干细胞特征的iPS细胞。2007年, Yamanaka实验室^[2]及Thomson实验室^[3]分别用逆转录病毒(retrovirus)与慢病毒(lentivirus)载体将4种转录因子OCT4、SOX2、c-MYC、KLF4或OCT4、SOX2、LIN28和NANOG感染人体皮肤成纤维细胞后将其回转成具有胚胎干细胞特性的人体iPS细胞。2008年, Daley等^[4-5]用4种干细胞转录因子(OCT4、SOX2、c-MYC和KLF4)将人体胎儿、新生儿及成人的皮肤与肺成纤维细胞逆

转成iPS细胞并用病人体细胞产生了不同疾病的病人iPS细胞。周琪实验室^[6]及高绍荣实验室^[7]也成功地产生小鼠的iPS细胞, 并由此iPS细胞产生了活体小鼠, 进一步证实了iPS细胞的胚胎干细胞功能。随后相继报道只用三种(OCT4、SOX2和KLF4)或两种转录因子(OCT4、KLF4或OCT4、c-MYC)即可将人体的体细胞或神经前体干细胞(neural progenitor cells, NPC)转化为iPS细胞^[8-9]。但只用三种或两种转录因子产生诱导多能干细胞的效率极低(0.0001%~0.001%), Liao等^[4]和Mali等^[10]通过增加其他基因(*SV40T*)将产生诱导多能干细胞的转化效率提高10~100倍。Wu等^[11]报道了只用单一OCT4即能将小

泰山医学院聊城临床学院引进人才基金(No.2011LCYYF001)和山东省科技厅(No.2011YD18054)资助项目

*通讯作者。Tel: 0635-8276009, E-mail: hanfabin2@gmail.com

鼠胚外组织细胞逆转成iPS细胞。

由于逆转录病毒与慢病毒载体能整合到细胞的基因组,具有引起基因突变和肿瘤的危险性,许多实验室采用瞬时转染方法产生无病毒载体和外源基因整合的iPS细胞。Okita等^[12]报道了用普通质粒载体转染小鼠体细胞产生非病毒整合的诱导多能干细胞,证明重编程转录因子的基因组整合并非是产生iPS细胞所必需的。随后三个实验室相继报道用不同方法成功的产生了无外源转基因表达的iPS细胞,为iPS细胞的临床应用进一步铺平了道路。美国Thomson实验室的Yu等^[13]用非病毒整合载体产生了人体iPS细胞。英国Kaji等^[14]与加拿大Woltjen等^[15]分别用单一载体的多蛋白表达方法产生iPS细胞,然后将整合到iPS细胞基因组中的外源基因切除产生非外源基因整合的iPS细胞。Soldner等^[16]用Dox诱导的loxP慢病毒载体(lentiviral FUW-tetO-loxP)产生了帕金森氏病人iPS细胞,再用Cre-重组酶切除外源基因产生了非病毒载体整合的帕金森氏病人特异的人体iPS细胞,并将此病人特异的诱导多能干细胞成功地分化成多巴胺神经元。这些PD病人iPS细胞不含有外源性的载体及转基因序列,因而克服了诱导多能干细胞临床应用的障碍。他们将PD病人iPS细胞分化的多巴胺神经元移植到大鼠的帕金森氏病动物模型,结果证明移植的多巴胺神经元能够存活16周以上并改善PD大鼠的运动行为^[17]。目前,人体诱导多能干细胞已经从不同的人体组织细胞产生,其中包括皮肤细胞、脂肪细胞、肺细胞、肝细胞、骨髓细胞、血液细胞、牙龈细胞和毛囊细胞等^[18-21]。

本文将对近年来体细胞重编程产生iPS细胞的机理、方法及其在神经退行性疾病研究中的应用等研究进展进行文献综述,同时指出其应用限制及发展前景。

2 体细胞重编程的方法与机理

体细胞重编程是将已经分化的体细胞(如皮肤成纤维细胞及血液淋巴细胞)在体外进行表观遗传学修饰使其逆转成具有多向分化能力的干细胞。目前,进行体细胞重编程的主要技术方法有体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)、细胞融合及干细胞转录因子诱导。早在1952年,Briggs等^[22]就报道了成功的核移植技术。他们将囊胚的细胞核移植到去核的豹蛙(*Rana pipiens*)卵细胞中产生了正常孵

化的小蝌蚪(tadpoles)。1996年, Gurdon等^[23]将tadpoles的小肠细胞核转移到去核的非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵细胞中产生了成体具有爬行能力的青蛙。核移植技术在哺乳动物取得突破性进展是在1996年英国Wilmot实验室克隆出了成年绵羊“Dolly”。他们将白脸羊的体细胞细胞核分离后移植到黑脸羊的去核卵子产生了活体白脸仔羊^[24-25]。随后,相继报道了用核移植技术克隆产生了牛、鼠、山羊、猪、猫和兔子等。直到2008年, Wood实验室^[26]用SCNT技术产生了人体早期克隆胚胎。他们将人体的成纤维细胞核移植到去核的卵子并在体外培养形成了桑椹期胚胎克隆(cloned blastocysts)。但由于伦理学与供体来源的限制, SCNT核移植技术难以用于临床应用研究。

早在1976年, Miller等^[27]就用胚胎干细胞融合技术进行体细胞重编程。他们用胸腺细胞与胚胎瘤细胞融合产生了具有多向分化能力的细胞,移植到小鼠体内能够形成具有三个胚层的畸胎瘤。Cowan等^[28]通过与人体胚胎干细胞融合后使人体成纤维体细胞转变为具有多能性的四倍体细胞。分子遗传学分析表明,体细胞与胚胎干细胞融合后形成的杂合子细胞在某些基因启动子区产生了表观遗传修饰如去甲基化等,提示体细胞基因组的部分区域发生重编程。由于胚胎干细胞提供了细胞重编程的所有细胞浆因子,融合细胞发生重编程的速度快、效率高。但通过细胞融合重编程技术产生的多能性细胞具有胚胎干细胞的染色体,因而在异体移植时仍然产生免疫排斥反应^[29]。

胚胎干细胞融合能使体细胞重编程产生多能性干细胞,表明胚胎干细胞含有诱导多能性的细胞因子。Yamanaka实验室^[1]通过反复筛选发现只用4个干细胞转录因子(OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC)即可以将小鼠和人的成纤维细胞重编程产生iPS细胞。除了用DNA表达干细胞转录因子外,其他实验室还用RNA、蛋白质及小分子化合物成功地产生了iPS细胞,表明重编程主要通过细胞的表观遗传学改变使分化的体细胞逆转成具有多能性的胚胎干细胞状态^[30-31]。

iPS细胞是人工体外诱导产生的具有多向分化性的干细胞,并能分化成除胚外组织以外的任何一种体细胞。多能性干细胞转录因子诱导体细胞重编程返回多能状态的机理还很不明确,但主要是通过

内源性多能性基因的活化和定向分化基因的抑制两方面作用。在iPS细胞产生过程中,体细胞发生了表观遗传学改变,其中包括细胞染色质的疏散打开及DNA去甲基化等。外源干细胞转录因子主要是通过活化内源性的多能性基因*OCT4*、*NANOG*等启动重编程,一旦内源性*OCT4*、*NANOG*被活化,外源性转录因子会自动灭活失去作用^[32]。在重编程过程中每个干细胞转录因子的作用不同,其中*OCT4*和*SOX2*起主要作用。

研究表明,在诱导体细胞重编程的过程中,干细胞转录因子诱导产生iPS细胞需要两个阶段(图1)。第一阶段在转录因子*c-MYC*、*KLF4*和*LIN28*的作用下体细胞转变为转化的细胞(transformed cell)。由于胚胎干细胞与肿瘤细胞有着很多相似之处,原癌基因*KLF4*与*c-MYC*在体细胞重编程中的作用是打开染色质的螺旋结构,暴露基因的启动子区以诱导体细胞发生转化,*KLF4*及*LIN28*通过抑制*p53*及细胞凋亡促进细胞转化。第二阶段是转化的细胞在*OCT4*、*SOX2*及*KLF4*的作用下进一步转变为iPS细胞。*OCT4*、*SOX2*结合在内源性*OCT4*、*SOX2*、*NANOG*及其下游基因的启动子区,活化这些基因,使细胞转化为iPS细胞。其中,多数为未完全重编程的iPS细胞,只有少数是完全重编程的iPS细胞^[33]。*OCT4*、*SOX2*及*KLF4*与内源多能性基因启动子结合使DNA发生去甲基化。*OCT4*与*SOX2*形成二聚体,一方面,可以调节下游基因,如*UTF1*、*FGT4*和*FBX15*;另一方面,也能自我调节*OCT4*和*SOX2*。全基因组分析发现,*OCT4*与*SOX2*在人体和小鼠胚胎干细胞中有许多共同的下游作用基因。因此,*OCT4*与*SOX2*都是保持细胞多能状态所必需的^[34-35]。*OCT4*主要在胚胎细胞、早期胚胎中表达。在胚胎发育中的表达主要在桑葚胚(blastomere)和内基质细胞(inner cell mass)。*OCT4*基因纯合缺失的小鼠胚胎在发育的着床期就不能存活^[36]。对*OCT4*基因抑制后,小鼠和人的胚胎干细胞会自发地向胚外组织分化,表明*OCT4*基因在维持细胞多能性方面起主要作用^[37]。用单一*OCT4*将胚外组织细胞逆转成iPS细胞或用*OCT4*与小分子化合物结合产生小鼠与人的iPS细胞,进一步证实*OCT4*在iPS细胞产生过程中的关键作用。*SOX2*主要是在胚胎干细胞中表达。*SOX2*与*OCT4*一样,其表达表明细胞处于未分化的多能状态。与*OCT4*不同的是,*SOX2*也在胚外组织中表达。另外,在发育

的神经细胞中,*SOX2*表达标志着细胞处于未完全定向的神经前体细胞状态(neural precursor cells)。研究表明,*SOX2*纯合缺失的小鼠胚胎由于原始外胚层不能发育,在着床前就不能存活。用基因敲除方法去除*SOX2*后,体外培养的小鼠胚胎干细胞向胚外组织分化而不能保持其多能状态^[38]。小鼠胚胎干细胞中敲除*SOX2*后,其多能性可以用*SOX2*或*OCT4* cDNA转染重新获得,表明*SOX2*的主要作用可能是保持*OCT4*的活化表达状态。在这重编程逆转过程中,有的细胞未发生转化,有的细胞部分转化,有的细胞完全转化为多能干细胞。*KLF4*能作为*OCT4*及*SOX2*二聚体的共存因子,起促进转化的多能干细胞成为完全成熟的iPS细胞^[39]。这也许就是体细胞重编程过程中真正完全重编程成为iPS细胞效率不高的原因。许多实验室正在采用不同的方法提高诱导多能干细胞的产生率。

在iPS产生过程中起作用的可能还包括小RNA(miRNA)。研究表明,miR-291-3p、miR-294及miR-295在ES细胞中表达并在整个细胞周期中调节和加强ES细胞的多能性。最近研究报道,miR-302能代替*OCT4*、*SOX2*等干细胞重编程因子使人体和小鼠的体细胞进行重编程产生iPS细胞^[40-41]。miR-302在人体胚胎干细胞中表达丰富,但在分化的组织细胞中不表达。关于这一非蛋白质编码小RNA进行重编程作用的机理不十分明确,研究提示,miR-302主要是作为一种抑制性调节因子抑制表观遗传因子,如

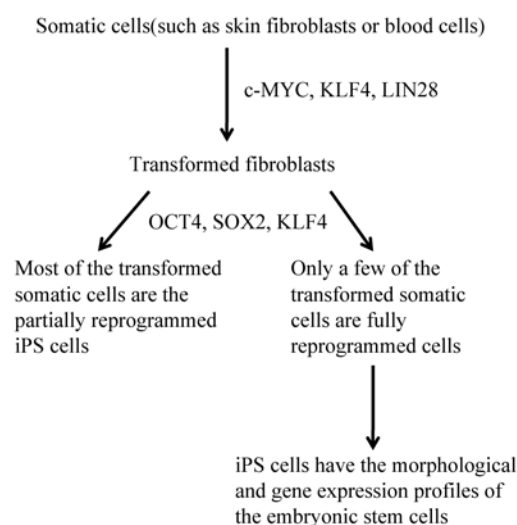


图1 干细胞转录因子体细胞重编程的作用机理
Fig.1 The mechanism of the somatic cell reprogramming through stem cell transcription factors

DNMT1、*MECP1/2*、*AOF2/1*、*KDM1/2*等,从而引起基因组的去甲基化促使体细胞内在的多能性基因活化产生iPS细胞。

3 诱导多能干细胞的产生方法

自Yamanaka首先用逆转录病毒载体将干细胞转录因子导入细胞产生诱导多能干细胞后,iPS细胞的产生方法不断改进。目前,iPS细胞产生方法主要有病毒载体、非病毒载体、mRNA、蛋白质及小分子化合物等几种方法。每种方法各有其优点和缺点(表1)。从研究疾病的实际应用方面考虑,用非病毒整合的Episomal plasmids及小分子化合物法是可行的方法。

3.1 用逆转录病毒或慢病毒整合载体产生iPS细胞

iPS细胞产生最早应用的是逆转录病毒载体将*OCT4*、*SOX2*、*c-MYC*和*KLF4*导入细胞基因组并表达此4种转录因子。由于逆转录病毒载体将转基因插入基因组能持续表达转基因,启动和活化细胞内在的多能性基因,促使体细胞向干细胞方向回转,因而iPS的产生效率较高。用逆转录病毒产生iPS细胞时,首先用转基因逆转录病毒载体及表达病毒结构蛋白(gag、pol及env)的质粒转染HEK293细胞产生

有活性病毒颗粒悬液,再用此病毒悬液转染体细胞如成纤维细胞或血液细胞后产生iPS细胞^[1,5]。用慢病毒载体产生iPS细胞首先由Thomson实验室报道,随后其他实验室也相继用此慢病毒方法产生iPS细胞^[42-43]。慢病毒载体属于逆转录病毒的一种,其特点是可以转染有分裂能力细胞和无分裂能力细胞,而逆转录病毒载体只能转染有分裂能力细胞。慢病毒载体将转基因随机地插入基因组而逆转录病毒载体一般将转基因插入到内源基因的转录起始点^[44]。逆转录病毒与慢病毒载体的另一差别是逆转录病毒产生iPS细胞后能够完全自我失活而慢病毒产生iPS细胞后转基因会持续低水平表达^[45],对iPS细胞的分化产生副作用。

3.2 用慢病毒载体外源基因切除法产生iPS细胞

尽管逆转录病毒与慢病毒载体能有效地产生iPS细胞,但iPS细胞含有病毒载体及转基因的整合,有引起插入突变的危险性,转基因自我失活后的重新活化也会导致肿瘤的发生,另外,残留的转基因表达会影响iPS细胞的发育分化能力。因此,用慢病毒载体产生iPS细胞要设法去除整合的慢病毒载体和转基因,建立无外源基因整合的iPS细胞。目前,使用的方法有两种:

表1 诱导多能干细胞产生方法及其优缺点比较

产生方法	优点	缺点	参考文献
Generation approaches	Advantages	Faults	References
Retrovirus plasmids	High efficiency of iPS cell generation, silencing of the transgenes	Genome integration to induce mutation, only infecting dividing cells, risk of tumorigenesis by the re-activation of transgenes.	1-2, 5
Lentivirus plasmids	High efficiency iPS cell generation, capability of infect dividing and non-dividing cells	Genome integration to induce mutation, incomplete silencing of the transgenes	3, 42
Excisable lenti-viral vectors	Efficient excision of the transgenes	Residue of 200~300 bp lenti-viral vectors in the genome	16, 46
PiggyBac transposons	Precise excision of the transgenes, no residue of the vector	Need longer time to generate iPS cells, low efficiency of transgene excision	15, 47
Episomal plasmids	No integration of the viral vectors and transgenes in the genome	Low efficiency of iPS cell generation	13, 49
Recombinant proteins	No integration of the viral vectors and transgenes in the genome	Low efficiency of iPS cell generation, complicated procedures	50-51
Small molecules (VPA, BIX02194, VitC, etc)	No integration of the viral vectors and transgenes in the genome	Low efficiency of iPS cell generation	52-54

一种方法是将干细胞重编程因子串联形成同时表达多个转基因的单一载体。在表达载体的两个转基因之间插入2A肽链片段(2A peptide)或IRES (internal ribosome entry site)。用此方法能保证每个细胞转染的细胞都同时表达4~6个干细胞重编程因子以提高重编程的效率。Sommer等^[46]用串联多个转基因载体产生小鼠iPS细胞,效率可以达转染细胞的0.5%。Jaenisch实验室^[16]在多个重编程因子串联表达的载体设计中利用Cre/loxP技术在转基因5'和3'端插入loxP位点。iPS细胞产生后再用表达重组酶(Cre-recombinase)的质粒将外源基因与插入载体切除。研究表明,通过Dox诱导的单一慢病毒载体同时表达4个重编程因子产生小鼠iPS细胞的效率达1/10⁶。尽管用Cre/loxP切除法产生的iPS细胞无外源基因整合,但这种方法产生的iPS细胞基因组中仍然存留200~300 bp的外源loxP DNA序列。实验分析证明,残留的DNA序列属于病毒载体无活性的LTR序列。

另一种外源基因切除产生iPS细胞的方法是用PB转位子系统(PiggyBac transposon system)。PB转位子的特点是在哺乳动物中有很高的基因组转位活性并可以进行准确的自我切除,不留DNA残留。Nagy实验室^[15]用PB转位子载体构建了多个转基因串联的表达系统并产生了人体和小鼠的iPS细胞。实验证明,90%以上的iPS细胞克隆不会有外源DNA存留。尽管此法产生iPS细胞的效率很低,但由于无外源DNA残留,iPS细胞更加安全,用于研究疾病机理和临床移植的价值较大。Yusa等^[47]通过增加载体的抗性选择优化了此法以利于鉴定无外源基因整合的iPS细胞。

3.3 用非病毒整合载体(Episomal plasmids)产生iPS细胞

体细胞重编程产生iPS细胞需要一定时间启动内源多能性基因并保持细胞的多能性基因处于活化状态,提示用非病毒整合载体瞬时表达干细胞重编程因子也有可能达到基因表达水平而引起体细胞重编程产生iPS细胞。用普通质粒和腺病毒载体产生iPS细胞的研究表明,转基因插入到细胞基因组并不是产生iPS细胞所必需的^[48]。Thomson实验室的于俊英研究员首先使用OriP/EBNAI载体(Episomal plasmids)表达多个干细胞重编程因子(OCT4、SOX2、NANOG、LIN28、c-MYC、KLF4及SV40T)

产生了无病毒载体整合的人体iPS细胞,但与其他方法相比,其iPS细胞产生效率非常低(0.0005%)。为提高用非病毒载体产生iPS细胞的效率,最近,程临钊实验室^[49]对OriP/EBNAI Episomal plasmid方法进行改良后串联表达5个干细胞重编程因子(OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC和LIN28)、SV40T抗原(Tg)和抑制p53的shRNA p53后将iPS细胞的产生效率提高了50~100倍。对抑癌基因p53进行抑制能提高iPS细胞的产生效率,提示抑制p53的表达能抑制细胞的定向分化。只用Episomal plasmid表达5个干细胞因子(OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC及LIN28)即可以用10⁶个体细胞产生50个iPS细胞。如果5个干细胞因子与第2个表达载体同时转染细胞,发现C5与Tg同时转染的效率最高,与shRNA p53同时转染的iPS细胞效率次之,与NANOG共同转染时iPS细胞效率与单独5个因子的效率相似^[49]。此方法产生的iPS细胞经传代10代以后,外源基因就能够从iPS细胞中消失,因此对研究疾病的发生机理和自体移植治疗具有明显的优势。

3.4 直接用重编程RNA及蛋白质产生iPS细胞

为避免引起细胞基因组改变的另一种iPS细胞产生方法就是直接将重编程mRNA或蛋白质导入细胞内。Warren等^[30]报道用合成的mRNA诱导人体细胞重编程产生iPS细胞。为避免细胞对抗外源RNA的免疫反应,他们对mRNA的5'-和3'-末端进行化学修饰以保证合成的RNA进入细胞后有效地表达多能性干细胞转录因子(OCT4、SOX2、c-MYC和KLF4)。结果表明,mRNA法能有效地产生iPS细胞,并且细胞基因组不产生任何损害。由于导入细胞的RNA在短时间内被细胞降解,需要用RNA转染细胞保证长时间表达重编程因子才能产生iPS细胞。Kim实验室^[50]通过HEK293细胞合成重编程蛋白质并产生了人体iPS细胞。为使细胞能摄取重编程的蛋白质因子,需要用一段肽链转导蛋白(poly-arginine)连接到重编程蛋白质因子。最近,Cho等^[51]用小鼠胚胎干细胞分离的蛋白质进行重编程也产生了iPS细胞,与DNA表达转基因方法相比,蛋白质方法需要更长的时间(8周),而且iPS细胞产生效率较低(0.001%)。但是,蛋白质方法产生的iPS细胞基因组发生突变的可能性非常小。

3.5 用小分子化合物产生iPS细胞

近年来的研究表明,用4个重编程因子OCT4、

SOX2、KLF4、c-MYC或2个重编程因子OCT4、SOX2或单一重编程因子OCT4均能产生iPS细胞,提示只有OCT4是不可替代的重编程因子。许多实验室在寻找能代替重编程因子的小分子化合物产生iPS细胞。这些小分子化合物起到促进重编程作用甚至能代替重编程因子。研究发现,小分子化合物组蛋白去乙酰酶抑制剂VPA能使iPS细胞的产生效率增加10~100倍,并证明VPA可以代替c-MYC和KLF4,促使人体成纤维细胞转化为iPS细胞^[52]。丁胜实验室^[53]发现钙离子拮抗剂(BayK 8644)组蛋白甲基转移酶与OCT4及KLF4一起作用能诱导体细胞重编程。Eggan实验室^[54]报道了TGF- β 信号转导抑制能代替SOX2和c-MYC诱导产生iPS细胞。最近,裴端卿实验室^[55]报道VitC可能通过抑制p53途径促进iPS细胞产生。

4 诱导多能干细胞在研究神经退行性疾病中的应用

自人体体细胞产生iPS细胞(克服了胚胎干细胞面临的伦理、宗教及资源不足等缺陷),为干细胞生物学的基础研究和临床应用开拓了广阔的前景。目前,对神经系统疾病及其他疾病发病机理的研究主要采用动物转基因或基因敲除模型(transgenic animals or knockout animals)。在用人体的细胞进行中

枢神经系统疾病的研究中,主要是用病人死后取得的大脑组织进行病理学或分子生物学的研究。一方面,这些样本保存不够完善;另一方面,这些样本只能代表疾病发展的最后阶段,不能真正全面地反映疾病过程中的分子、细胞水平的变化。这就限制了直接对疾病发生过程的神经病理与分子生物学分析。目前,神经退行性疾病的小鼠及大鼠的转基因或基因敲除模型,一般不能重现疾病的所有临床表现,且鼠类模型仅用于单基因遗传病的研究。啮齿类动物与人类还存在着种属的差异,这就意味着对人体疾病的深入研究需要更接近于人体发育过程的体外模型。iPS细胞的研究成功为研究胚胎发育的内在机制、人体疾病的发病机理、筛选临床药物和自体细胞移植为基础的遗传病治疗创造了人体细胞模型(图2)。

4.1 帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)

PD是继老年性痴呆症后的第二大神经退行性疾病,在临床上表现为震颤、僵直、运动缓慢及步态不稳,另外伴有其他精神症状,其根本原因是中脑多巴胺神经元凋亡。本病以散发为主,家族性病例占20%左右。分子遗传学研究已经鉴定出多个与PD发病相关的基因和遗传位点,如 α -Synuclein(SNCA)、Parkin、DJ-1、PINK1、LRRK2、NURR1等^[55-56]。用突变的SNCA在人体胚胎干细胞中过量表达发现分

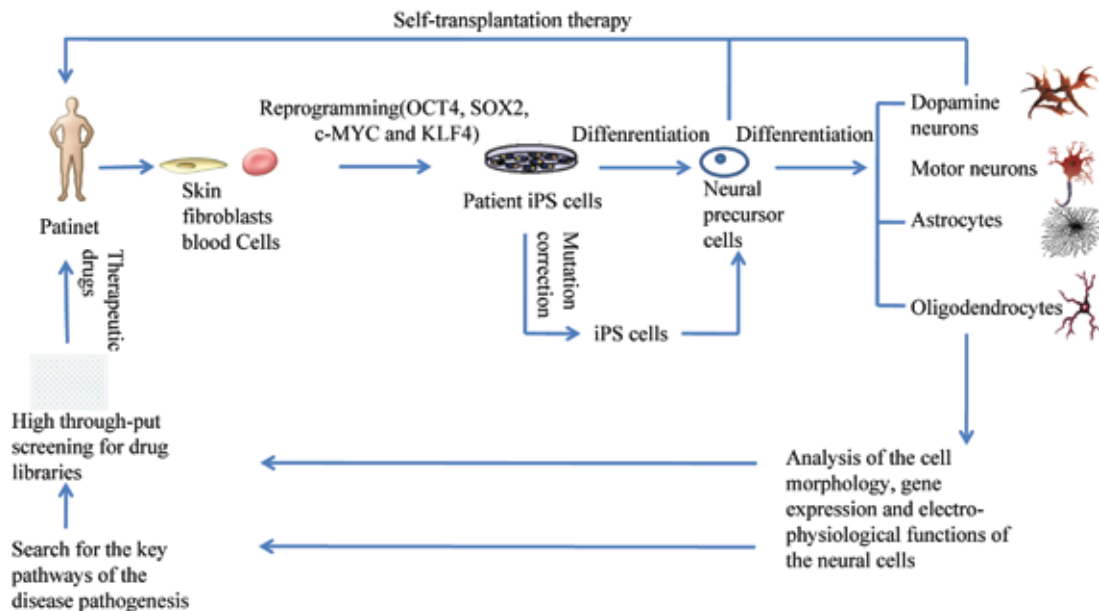


图2 病人iPS细胞用于研究神经退行性疾病的发病机理、药物筛选及自体移植治疗

Fig.2 The application of the patient iPS cells in studying the disease mechanisms, drug screening and self-transplantation therapy for the neurodegenerative diseases

化的多巴胺神经元存活力降低^[57]。Daley实验室^[16]和Jaenisch实验室^[17]报道了PD病人iPS细胞的产生及分化成多巴胺神经元, 虽然未见到病人iPS细胞与正常人iPS细胞分化的多巴胺神经元的差异, 可能是由于差别不显著而不能从细胞表型显现出来。PD病人iPS细胞分化的多巴胺神经移植到动物模型能改善大鼠的运动功能^[16-17]。最近, Seibler等^[58]报道了具有*PINK1*基因突变PD病人iPS细胞的产生。此iPS细胞分化成多巴胺神经元后, Parkin介导的线粒体趋化能力受到损伤而且细胞内线粒体数目增多。用*PINK1*基因转染具有*PINK1*突变的神经元, 发现过量表达*PINK1*能改善*PINK1*突变多巴胺神经元的表型与功能, 提示突变的*PINK1*功能下降通过损伤线粒体功能引起多巴胺神经元凋亡。另外, *LRRK2*与*SCNA*基因突变的PD病人iPS细胞受基因突变影响, 多巴胺神经元脆性增加, 易于受到氧化损伤等环境因素影响而凋亡^[59]。

4.2 老年性痴呆症(Alzheimer' disease, AD)

老年性痴呆症(AD)是最常见的老年人神经退行性疾病, 病人的主要临床表现为进行性的记忆力减退和健忘。病理上发现, 病人大脑皮层萎缩及广泛的神经细胞减少, 并伴有大量的神经纤维聚集形成的蛋白体(amyloid fibril plaque)。蛋白聚集体的主要成分是由APP蛋白(amyloid precursor protein)经酶切产生的A β 肽(β -amyloid)形成。在大脑中A β 肽的聚集导致神经细胞的退行性病变, 逐渐引起神经细胞丢失。分子遗传学研究已经鉴定出*APOE*、*PS1*、*PS2*及*APP*基因突变是导致AD的主要遗传因素^[60]。Yagi等^[61]产生了具有*PS1*和*PS2*基因突变的iPS细胞。他们将具有*PS1*和*PS2*突变的iPS细胞分化成神经元。虽然表型上与正常人iPS细胞分化的神经元无明显差异, 但在*PS1*和*PS2*基因突变的iPS细胞分化的神经元细胞中会有更多的A β 肽聚集, 证实了A β 肽聚集导致AD发病的机理。另外, 对AD病人iPS细胞分化的神经元进行较长时间培养和分析可能会引起*PS1*及*PS2*基因突变, 影响神经细胞形态和功能的表型改变。

4.3 脊髓侧索硬化病(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)

ALS是一种进行性发展的神经退行性疾病, 主要分家族性和散发性两种。在家族性遗传性ALS中, 80%是由于超氧化物歧化酶(*SOD1*)基因突变造成运

动神经元的退行性改变, 引起肌肉萎缩与瘫痪。病人起病一般在40~50岁左右, 发病后一般在2~5年内出现严重的运动障碍或致死。其发病机理虽不完全明确, 但主要是由于细胞内异常的蛋白聚集毒性导致运动神经完全凋亡。研究显示, 用人体胚胎干细胞过量表达突变的*SOD1*蛋白可引起胚胎干细胞分化的运动神经元存活能力下降及细胞数目减少^[62]。Dimos等^[63]用体细胞重编程技术产生了iPS细胞并诱导分化神经元, 但是与正常对照iPS细胞分化的运动神经元相比较, 未能鉴定出表型改变, 也可能是由于细胞内其它基因的互补作用在运动神经元发育的早期不能表现出表型及功能异常。Mitne-Neto等^[64]突变*VAPB*基因产生iPS细胞, 结果表明突变*VAPB*基因, iPS细胞分化的运动神经元表达明显下降, 提示*VAPB*基因在ALS的发病过程中起着重要的作用。

4.4 脊髓肌肉萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)

SMA是一种常染色体隐性遗传病, 主要是由于*SMN*基因的点突变或缺失突变引起运动神经元功能丧失, 导致肌肉萎缩及对称性下肢瘫痪。病人通常在出生后发病并由于呼吸肌麻痹导致儿童2~4年内死亡。Svendsen实验室^[67]用iPS细胞研究*SMN1*基因突变在脊髓肌肉萎缩症中的致病作用。他们用慢病毒载体表达OCT4、SOX2、NANOG和LIN28产生了SMA病人诱导多能干细胞并将其分化为运动神经元。由SMA病人iPS细胞分化的运动神经元与对照相比, 存活能力下降并在细胞内出现较多的蛋白聚集, 提示*SMN1*基因突变导致细胞过量蛋白质聚集, 从而导致细胞毒性^[65]。

4.5 舞蹈病(Huntington's disease, HD)

HD是一种呈常染色体显性遗传的神经退行性疾病, 这是由于*HTT*基因中出现多个串联的CAG重复序列从而产生异常的Huntington蛋白造成细胞毒性而发生神经细胞的退行性改变。如果CAG重复序列在35个以下病人不会发病, 但是当CAG重复超过40个以上会发展成舞蹈病。Lorincz等^[66]用基因打靶技术产生了具有150个CAG重复序列的转基因小鼠模型, 并将分离出的小鼠胚胎干细胞分化成神经细胞。结果发现, 具有CAG突变的神经元多数分化产生胶质细胞。Bradlen等^[67]分离出具有40~48个CAG重复序列的胚胎干细胞, 但分化成神经细胞后未能发现异常表型改变。Park等^[68]从具有72个CAG重复序列的舞蹈病人产生了病人iPS细胞。用此iPS

细胞分化的神经元易于受到损伤后凋亡,表现类似HTT蛋白聚集的毒性作用。研究发现,神经细胞中谷氨酰胺载体的表达减少,从而使细胞易于受到内毒素谷氨酰胺(glutamate)的损伤,表明iPS细胞用于研究疾病机理更具有优越性。

另外,其他神经发育障碍疾病的iPS细胞也相继被报道用于研究Rett综合征(Rett syndrome)、精神分裂症(Schizophrenia)、X染色体易损综合征(Fragile X syndrome)及唐氏综合征(Down syndrome)的发病机理等^[69-72]。目前,已建立的神经退行性疾病及神经发育障碍疾病的iPS细胞,概括总结见表2。

表2 神经退行性疾病及神经发育障碍疾病病人iPS细胞
Table 2 iPS cells from patients with neurodegenerative diseases and neuro-developmental disorders

疾病类型 Disease types	基因突变 Gene mutations	参考文献 References
Parkinson's disease	<i>LRRK2, PINK1,</i> unknown gene	58-59, 72
Alzheimer's disease	<i>PS1, PS2</i>	61
Amyotrophic lateral sclerosis	<i>SOD1, VAPB</i>	63-64
Spinal muscular atrophy	<i>SMN</i>	65
Huntington's disease	<i>HTT</i>	68
Rett syndrome	<i>MECP2</i>	70
Schizophrenia	<i>DISC1</i>	69
Fragile X syndrome	<i>FMR</i>	71
Down syndrome	<i>Trisomy 21</i>	72

5 应用iPS细胞模型筛选神经退行性疾病的药物及自体细胞移植治疗

人体iPS细胞的产生为进行高通量药物筛选提供了特异的人体细胞模型。如PD病人的iPS细胞分化成多巴胺神经元后,可以根据病人iPS细胞来源的多巴胺神经元表型及基因组分子水平的改变,大量筛选能够改善或恢复多巴胺神经元表型和功能的药物库。特别是对已经进行临床前试验和临床试验批准的药物,一旦发现有效的药物,可以直接用于临床治疗PD病人。Desbordes等^[73]设计了384孔板的试验,用人体胚胎干细胞筛选能够促进人体胚胎干细

胞进行自身增殖(self-renewal)或分化的小分子化合物。用此方法他们鉴定出了促进人体胚胎干细胞的短期增殖或决定早期定向分化的几种临床上应用的药物与天然化合物。Barbaric等^[74]报道了一种影像学实验方法用于检测影响人体胚胎干细胞存活能力与多向分化能力。他们的实验包括测量人体胚胎干细胞(hES细胞)克隆中的细胞数、克隆的形态与大小、细胞核染色的强度以及细胞表达多能性标志物TRA-1-60的百分比。他们筛选了1 040种小分子化合物库,发现17种能促进hES细胞分化,5种化合物能促使hES细胞存活。

Andrew等^[75]用hES细胞设计96孔板试验,筛选了20 000种小分子化合物,最初鉴定出促进人体胚胎干细胞存活的小分子化合物4 000多种,并进一步验证确定了12种化合物具有促进胚胎干细胞存活的作用。到目前为止,许多神经系统疾病的诱导多能干细胞模型已经建立并逐步完善,但还没有用于药物筛选的报道。我们期望不久的将来就会研发出筛选药物iPS细胞试验,鉴定出用于治疗神经系统性疾病的药物。但用疾病iPS细胞设计筛选药物试验的关键是选择iPS细胞病理改变表型一致的细胞群以便使筛选的药物结果具有可重复性。尽管疾病iPS细胞的表型改变主要是在分化的成熟细胞(如多巴胺神经元和运动神经元等),但由于神经细胞分化筛选药物时间长,用很长时间改变影响,不利于高通量药物筛选。今后可能需要设计作用于神经细胞分化早期的神经前体干细胞的实验,用于广泛的药物筛选。

iPS细胞产生的最终目标是应用iPS细胞技术进行疾病的治疗。一方面,iPS细胞来自成体细胞克服了胚胎干细胞的伦理学及资源不足的缺点;另一方面,也克服了异体移植的免疫排斥作用,使iPS细胞具有广泛的应用治疗前景。但是对于带有基因突变的iPS细胞,在进行自体移植前首先要用分子生物学方法去除已有的基因突变,使其恢复到正常野生型基因状态。最常用的基因打靶去除突变的方法包括同源重组法和锌指核酸酶法(zinc finger nucleases, ZFNs)。一旦对iPS细胞的基因突变进行改正,即可以进行iPS细胞的分化和移植。Hanna等^[76]通过同源重组法用正常 β -球蛋白基因代替小鼠镰刀型贫血模型中缺陷的基因,结果发现,基因突变改正的iPS细胞来源的造血前体干细胞能够有效地减轻贫血并恢

复疾病动物的贫血症状。Jaenisch实验室^[77]产生了具有 α -Synuclein基因突变的PD病人iPS细胞, 然后用锌指核酸酶法(ZFNs)改正突变的 α -Synuclein基因。结果表明, α -Synuclein基因突变的修复并不影响iPS细胞分化为多巴胺神经元的能力。此方法的成功建立为进一步研究疾病机理和以iPS细胞为基础的细胞移植治疗提供了坚实的实验基础。

6 诱导多能干细胞应用存在的问题与未来研究的挑战

人体iPS细胞除了用于细胞移植治疗外, 目前, 主要用于建立疾病模型研究发病机理和药物筛选。根据动物实验与疾病iPS细胞模型鉴定出确认的表型改变是研究发病机理和药物筛选的关键条件和前提。因此寻找新的致病分子机理和细胞表型改变是今后研究的发展方向。将分子遗传学、转录基因组学、蛋白组学方法与iPS细胞技术相结合才能鉴定出疾病过程中细胞改变和功能改变的致病分子路径, 寻找疾病发生过程中的关键靶基因和采取措施。

与其他体细胞重编程方法相比(如SCNT、胚胎细胞融合), 用干细胞转录因子进行重编程方法简单有效, 而且产生的iPS细胞保持正常的核型, 使其具有广泛的研究与应用前景。但是, iPS细胞也有其本身的缺陷和问题, 需要进一步研究。

(1)用于产生iPS细胞的原癌基因蛋白c-MYC应当设法去除。研究报道只用3种或2种因子(省去c-MYC)产生小鼠iPS细胞, 由此iPS细胞产生的嵌合体小鼠没有发现成瘤问题。Zhu等^[78]用OCT4与小分子化合物产生iPS细胞排除了c-MYC的致癌性。

(2)由于病毒载体介导的外源基因整合到基因组可能打破正常的基因结构或产生新的融合基因等副作用。许多实验室产生了无病毒载体外源基因整合的iPS细胞。Jaenishi实验室^[16]用被cre-recombinase切除的慢病毒载体产生帕金森氏病病人的iPS细胞。iPS细胞产生后再用cre-recombinase将外源基因切除并分化成多巴胺神经元, 移植到帕金森氏病大鼠模型后能改善其运动行为功能。由于此法产生iPS细胞效率极低, 实际应用价值较小, Chou等^[49]最近报道了改进的Episomal plasmids载体能有效地产生无病毒载体整合的iPS细胞, 为临床应用提供了可行的实验方法。

(3)由于完全重编程的iPS细胞产生效率极低,

许多实验室通过不同途径来增加iPS细胞的产生效率。Esteban等^[54]通过改进细胞培养液的成分使iPS细胞效率提高10~50多倍。Mali等^[79]用Butyrate sodium能增加iPS细胞的产生效率50倍以上^[79]。

(4)由于各实验室使用的iPS细胞产生方法不同, iPS细胞系之间存在较大的差异, 如iPS细胞的基因组及表观遗传学差异等。这些改变可能会影响到iPS细胞的分化功能及疾病模型研究结果。iPS细胞在临床应用前要克服iPS细胞系之间存在差异的问题。

(5)将iPS细胞分化成不同神经细胞的实验方法需要进一步优化以确定神经细胞发育过程中需要各种生长因子的最佳浓度, 从而提高iPS细胞分化成不同神经细胞的分化效率。

将疾病特异的iPS细胞与药物治疗结合起来已经证实了iPS细胞的可用性。期望今后在病人iPS细胞研究遗传病发病机理、筛选疾病治疗药物和iPS细胞为基础的细胞移植等方面取得新进展。

最近的研究表明, 成人的皮肤成纤维细胞可以通过特异的转录因子诱导成为有功能的多巴胺神经元, 进一步拓宽了病人体细胞模型的研究^[80]。然而, 诱导多能干细胞与体细胞重编程仍然处于早期研究阶段, 存在的许多问题亟待今后解决, 以便为临床应用提供科学的依据。

致谢

特别感谢陈超和王伟在图表制作方面的技术支持帮助。

参考文献 (References)

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 3 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 4 Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 2008; 18(5): 600-3.
- 5 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- 6 Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, *et al.* iPS cells

- produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461(7260): 86-90.
- 7 Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 2009; 5(2): 135-8.
 - 8 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
 - 9 Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454(7204): 646-50.
 - 10 Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, *et al.* Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26(8): 1998-2005.
 - 11 Wu T, Wang H, He J, Kang L, Jiang Y, Liu J, *et al.* Reprogramming of trophoblast stem cells into pluripotent stem cells by OCT4. *Stem Cells* 2011; 29(5): 755-63.
 - 12 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322(5903): 949-53.
 - 13 Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324(5928): 797-801.
 - 14 Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 2009; 458(7239): 771-5.
 - 15 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.
 - 16 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136(5): 964-77.
 - 17 Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, *et al.* Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(36): 15921-6.
 - 18 Kunisato A, Wakatsuki M, Kodama Y, Shinba H, Ishida I, Nagao K. Generation of induced pluripotent stem cells by efficient reprogramming of adult bone marrow cells. *Stem Cells Dev* 2009; 19(2): 229-38.
 - 19 Ye Z, Zhan H, Mali P, Dowe S, Williams DM, Jang YY, *et al.* Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 2009; 114(27): 5473-80.
 - 20 Wada N, Wang B, Lin NH, Laslett AL, Gronthos S, Bartold PM. Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol Res* 2011; 46(4): 438-47.
 - 21 Higgins CA, Itoh M, Inoue K, Richardson GD, Jahoda CA, Christiano AM. Reprogramming of human hair follicle dermal papilla cells into induced pluripotent stem cells. *J Invest Dermatol* 2012; doi: 10.1038/jid.2012.12.
 - 22 Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; 38(5): 455-63.
 - 23 Gurdon JB, Byrne JA. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14): 8048-52.
 - 24 Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380(6569): 64-6.
 - 25 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810-3.
 - 26 French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26(2): 485-93.
 - 27 Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* 1976; 9(1): 45-55.
 - 28 Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; 309(5739): 1369-73.
 - 29 Matsumura H, Tada M, Otsuji T, Yasuchika K, Nakatsuji N, Surani A, *et al.* Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. *Nat Methods* 2007; 4(1): 23-5.
 - 30 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 618-30.
 - 31 Yuan X, Wan H, Zhao X, Zhu S, Zhou Q, Ding S. Brief report: Combined chemical treatment enables OCT4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem Cells* 2011; 29(3): 549-53.
 - 32 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
 - 33 Chan EM, Ratanasirintrao S, Park IH, Manos PD, Loh YH, Huo H, *et al.* Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 2009; 27(11): 1033-7.
 - 34 Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 2009; 136(2): 364-77.
 - 35 Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 2009; 136(4): 509-23.
 - 36 Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor OCT4. *Cell* 1998; 95(3): 379-91.
 - 37 Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23(3): 299-305.
 - 38 Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, *et al.* Pluripotency governed by SOX2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 625-35.
 - 39 Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, Masui S, Takahashi K, Yagi R, *et al.* Klf4 cooperates with Oct3/4 and SOX2 to activate the

- Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2006; 26(20): 7772-82.
- 40 Lin SL, Chang DC, Lin CH, Ying SY, Leu D, Wu DT. Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(3): 1054-65.
- 41 Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 376-88.
- 42 Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 340-5.
- 43 Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(37): 15720-5.
- 44 Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* 2003; 300(5626): 1749-51.
- 45 Hotta A, Ellis J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem* 2008; 105(4): 940-8.
- 46 Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 2009; 27(3): 543-9.
- 47 Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 2009; 6(5): 363-9.
- 48 Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2008; 2(3): 230-40.
- 49 Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Doney SN, Resar LM, *et al.* Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 2011; 21(3): 518-29.
- 50 Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-6.
- 51 Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 2010; 116(3): 386-95.
- 52 Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
- 53 Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, Scholer HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by OCT4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 568-74.
- 54 Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 6(1): 71-9.
- 55 Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 57-87.
- 56 Grimes DA, Han F, Panisset M, Racacho L, Xiao F, Zou R, *et al.* Translated mutation in the Nurr1 gene as a cause for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21(7): 906-9.
- 57 Schneider BL, Seehus CR, Capowski EE, Aebischer P, Zhang SC, Svendsen CN. Over-expression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation. *Hum Mol Genet* 2007; 16(6): 651-66.
- 58 Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 2011; 31(16): 5970-6.
- 59 Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, *et al.* LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 267-80.
- 60 Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, *et al.* Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 2010; 303(18): 1832-40.
- 61 Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, *et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011; 20(23): 4530-9.
- 62 Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggan KC. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 637-48.
- 63 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218-21.
- 64 Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, Bengtson MH, Joazeiro CA, Tsuda H, *et al.* Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet* 2011; 20(18): 3642-52.
- 65 Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(7227): 277-80.
- 66 Lorincz MT, Zawistowski VA. Expanded CAG repeats in the murine Huntington's disease gene increases neuronal differentiation of embryonic and neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2009; 40(1): 1-13.
- 67 Bradley CK, Scott HA, Chami O, Peura TT, Dumevska B, Schmidt U, *et al.* Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev* 2010; 20(3): 495-502.
- 68 Zhang N, An MC, Montoro D, Ellerby LM. Characterization of human Huntington's disease cell model from induced pluripotent stem cells. *PLoS Curr* 2010; 2: RRN1193.
- 69 Chiang CH, Su Y, Wen Z, Yoritomo N, Ross CA, Margolis RL, *et al.* Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry* 2011; 16(4): 358-60.
- 70 Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D, Pasceri P, Weksberg R, Hotta A, *et al.* Isolation of MECP2-null Rett syndrome

- patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 2011; 20(11): 2103-15.
- 71 Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(5): 407-11.
- 72 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- 73 Desbordes SC, Placantonakis DG, Ciro A, Socci ND, Lee G, Djaballah H, *et al.* High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(6): 602-12.
- 74 Barbaric I, Gokhale PJ, Jones M, Glen A, Baker D, Andrews PW. Novel regulators of stem cell fates identified by a multivariate phenotype screen of small compounds on human embryonic stem cell colonies. *Stem Cell Res* 2010; 5(2): 104-19.
- 75 Andrews PD, Becroft M, Aspegren A, Gilmour J, James MJ, McRae S, *et al.* High-content screening of feeder-free human embryonic stem cells to identify pro-survival small molecules. *Biochem J* 2010; 432(1): 21-33.
- 76 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 77 Soldner F, Laganieri J, Cheng AW, Hockemeyer D, Gao Q, Alagappan R, *et al.* Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 2011; 146(2): 318-31.
- 78 Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, *et al.* Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 2010; 7(6): 651-5.
- 79 Mali P, Chou BK, Yen J, Ye Z, Zou J, Doney S, *et al.* Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells* 2010; 28(4): 713-20.
- 80 Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 2011; 476(7359): 224-7.

The Applications of the Induced Pluripotent Stem Cells in Studying the Neurodegenerative Diseases

Han Fabin*

(Center for Stem Cells and Regenerative Medicine, the Affiliated Liaocheng Hospital, Taishan Medical University, Shandong 252000, China)

Abstract It is the prominent breakthrough in stem cell research to generate the induced pluripotent stem cells (iPS cells) through the somatic cell reprogramming of the stem cell transcription factors OCT4, SOX2, c-MYC and KLF4. In recent years, continuous progress has been made in the iPS cell research. Since the iPS cells are generated from the somatic fibroblasts or blood cells, they avoid the concerns on the ethics and immune rejections and open the windows for their clinical applications to study the mechanisms, drug screening and self-transplantation therapy of the human diseases. Here we summarized the recent advances in the methods of iPS cells, the mechanisms of reprogramming by transcription factors and the applications of the iPS cells in research on some neurodegenerative diseases and neurodevelopmental diseases. We also discussed the recent advance in using the iPS cells models from patients with Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease and spinal muscular atrophy to explore the molecular mechanism of the mutations in the genes for these diseases.

Key words induced pluripotent stem cells (iPS cells); somatic cell reprogramming; neurodegenerative diseases

This work was supported by the Laboratory Set-up Fund of Liaocheng Hospital, Taishan Medical University (No.2011LCYYF001) and the Development Fund Department of Science & Technology of Shandong Province (No.2011YD18054)

*Corresponding author. Tel: 86-635-8276009, E-mail: hanfabin2@gmail.com