

热点评析

重编程与成纤维细胞直接转化为其它终末分化细胞

郭礼和

从干细胞(包括胚胎干细胞、成体干细胞)到体细胞克隆再到诱导性多能干细胞(iPSCs)的研究,这是生命科学领域近三十年研究发展的主线。当前,iPSCs的研究成为最大的热点。随着人类社会进入二十一世纪第二个十年,干细胞研究会怎样发展?这是我们需要慎重考虑的问题。

细胞生物学是上世纪70年代通过分子生物学发展和推动、并深入到细胞范围内由经典细胞学研究演化而来的。到了本世纪初已代替分子生物学成为生命科学的领头羊了。尤其是干细胞的研究发展,已将发育生物学、遗传学(包括表观遗传学)和神经生物学统一起来,它们的科学领域界限已经模糊,研究主线越来越趋同和归一。这条主线是什么?我想这与上面提到的干细胞研究会怎样发展应是同一问题了。

iPSCs研究已带动了基因组表达与控制的编程与重编程研究,这是一切生命活动和演绎的基础,细胞的生长、发育、分化、凋亡都与之密切相关。对“编程与重编程”的探索,不仅是对生命奥秘的阐述,而且能控制及改造生命活动和演绎。今后十年“编程和重编程”的研究有可能成为细胞生物学、发育生物学、分子遗传学和表观遗传学等领域研究的热点,它可以从多角度、多层次、多学科来协同研究。

“编程”是由细胞本身基因组和表观遗传结构所决定的,这在发育生物学和肿瘤生物学领域是一个重要的研究主题;“重编程”是由外界环境和因子对细胞内在“编程”进行干预而发生的细胞分化程序性的变化,这是再生医学领域研究的主题。当然,利用“重编程”研究技术也可以探索细胞“编程”的内在机制。

iPSCs研究是用与发育有关的转录调控因子来干预成纤维细胞的内在“编程”,使其返回到具有胚胎干细胞特性的状态,从而代替来自早期胚胎的干

细胞,这样在临床上应用时不仅避开了伦理问题,同时也解决了细胞基因配型问题,这在再生医学研究方面取得了突破性的进展。

成纤维细胞是人体上最容易拿到的细胞类型,因为它在人的皮肤内最为丰富,体外培养也最容易,故而用它来研究细胞“重编程”是最好不过的。但是,对成纤维细胞重编程的机制知之甚少。目前对多能性诱导的重编程因子理想表达谱还无法达到,不能建立细胞诱导过程的稳定多能状态,故而“重编程”机制的研究问题仍然很复杂。

由于重编程中间过程共同表达的一些基因与有些分化谱系(例如神经元、表皮和血液等)有关,这就提供了一种可能性:在特殊条件下,成纤维细胞有可能直接被定向诱导成特殊的谱系。最近的一些研究证明,成纤维细胞可直接转化为许多终末细胞类型(如神经细胞、心肌细胞和巨噬细胞样细胞)。尽管有些研究是在小鼠模型中探讨成纤维细胞直接转化为终末分化细胞的,但可推测这些研究成果将来会在临床上有很大的应用前景。

2010年成纤维细胞在“编程与重编程”研究方面有很大进展,本文在这里重点介绍成纤维细胞通过体外“重编程”直接转化为终末分化细胞的研究情况,这些工作对iPSCs研究是一个重大补充及修正。利用基因组的重编程直接将成纤维细胞转化成神经细胞、心肌细胞和血细胞等,这样可避开制备iPSCs程序,减少制备iPSCs所带来的风险,同时又能避免人为因素造成研究的复杂性,也能大大增加细胞的转化效率,提高临床应用的安全性。

早在2008年,美国哈佛大学医学院和波士顿儿童医院研究人员在患有糖尿病的老鼠身上做了实验,将普通的外分泌细胞直接转化成可分泌胰岛素的胰岛 β 细胞,减轻了病情。他们注射冷冻的普通腺病毒,把三种基因(*Ngn3*、*Pdx1*和*Mafa*)移植到缺乏胰岛 β 细胞的病鼠胰腺内,结果胰腺内大约20%的外

分泌细胞转化成胰岛 β 细胞。胰岛 β 细胞增加,分泌的胰岛素相应增多,病鼠体内过高的血糖水平降低,糖尿病的病情得到减轻。

2008年美国 and 西班牙合作, Ru Feng 等人报道了PU.1和C/EBP两种因子可将成纤维细胞转化为巨噬细胞。这种分化的细胞能吞噬小颗粒和细菌,可部分引起炎症反应,生长严格依赖CSF-1。骨髓样转换主要由PU.1诱导,C/EBP的功能是对巨噬细胞特异基因表达起到调控作用。

2010年美国斯坦福大学医学院以Marius Wernig为首的研究人员宣布,在体外实验避开制备iPSCs这一步骤,直接将鼠皮肤成纤维细胞转化为神经细胞(图1)。他们首先选择了19个与细胞重编程或神经发育有关的基因,利用慢病毒将这些基因转染鼠胚胎成纤维细胞。培养22天后,其中一些细胞开始向神经细胞转化(图2)。随后筛选出3个基因(*Ascl1*、*Brn2*(也叫*Pou3f2*)和*Myt1l*),再次利用慢病毒将其转染小鼠胚胎和/或成年的成纤维细胞。继续培养一周后,约20%的实验鼠皮肤细胞能转化为神经细胞。这些神经细胞不但可以表达神经细胞特异蛋白,表现出功能性的动作电位,而且可与已有的其他

神经细胞形成突触。这项研究工作不仅避开了iPSCs研制的工作,而且大大提高了细胞转化效率和缩短了研究周期。

2010年8月美国加州大学旧金山分校以Masaki Ieda为首的研究人员在国际著名刊物*Cell*上发表了题为“用几种限定的因子直接重编程成纤维细胞转化为有功能的心肌细胞(Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors)”的文章。研究者用与发育有关的三种转录因子(*Gata4*、*Mef2c*和*Tbx5*)能够快速、高效地将心脏和皮肤成纤维细胞转化成心肌样细胞。这种分化细胞表达心肌细胞所特有的分子标志物,与心肌细胞具有相同的全基因表达谱,也具有自主收缩功能。转染了三种上述基因的成纤维细胞培养一天之后,移植到小鼠心脏也能分化成心肌样细胞。这些研究结果表明上述三种转录因子已经能使成纤维细胞发生重编程,使之转化成心肌细胞,这在临床治疗上有着重大意义。

2010年加拿大以Eva Szabo为首的研究人员在*Nature*上发表了题为“人成纤维细胞直接转换成多谱系造血祖细胞(Direct conversion of human fibro-

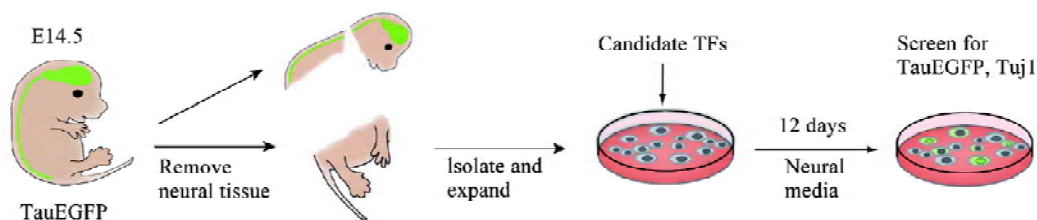


图1 用神经发育有关因子诱导鼠皮肤成纤维细胞直接转换为神经细胞的实验流程图(图片来源: *Nature* 2010; 463: 1035-41)

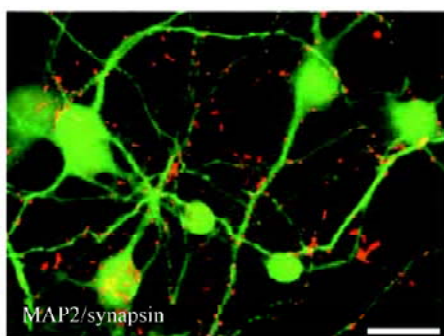


图2 诱导22天后形成的神经元形态

绿色标记为MAP2(神经元标志物),红色标记为SYNAPSIN(突触蛋白)(图片来源: *Nature* 2010; 463: 1035-41)

blasts to multilineage blood progenitors)”的文章。在多能性重编程过程中转染OCT4的人类皮肤成纤维细胞(Fibs)表达了一些分化细胞特有的分子标记,包括人类泛造血标记CD45。同时,他们考虑到OCT2(也称为POU2F2)和OCT1(也称为POU2F1)可以结合到OCT4作用的DNA靶标基序,并且这种结合在淋巴细胞发育中发挥着重要作用,故而推测OCT4有可能参与造血分化的启动。于是,他们通过OCT4的异位表达,来探索人类成纤维细胞直接转变为多能造血祖细胞的可能性。

他们用OCT4转染成人皮肤和新生儿包皮的成

纤维细胞(Fibs), 得到的 $\text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 为 CD45^+ 细胞(图3)。 CD45^+ 细胞($\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$) OCT4 表达越高, 成纤维细胞特有的基因表达也就越低。这种细胞大约有 1 000 个基因表达下调和相等数目的基因上调, 才会导致 Fibs 转变为 CD45^+ 表型。然后, 他们使用在早期造血过程中起重要作用的生长因子 Flt3(FMS样酪氨酸激酶 3)和 SCF(干细胞因子)处理 $\text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 。经过 Flt3LG 和 SCF 处理的 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$, 可使克隆数提高 4~6 倍, 而 Fibs 对照组没有任何变化。这些结果表明, 在早期造血细胞生长因子刺激的条件下, OCT4 足以启动多种来源的 Fibs 产生造血样的 CD45^+ 细胞, 不需要经过 iPSCs 诱导的过程。

全基因表达分析表明, $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 与外周血(MPB)来源的单核细胞和脐带血(UCB)的造血祖细胞(CD34^+ 细胞)能群聚共生, 说明 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 具有生成多种类型血细胞的潜能。用支持人血祖细胞生长和扩增的细胞因子鸡尾酒法, 对 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 进行培养, 可获得髓系特异标记的 CD33 和 CD13 细胞。进一步培养, 可得到表达 CD14 的单核细胞; 再用 M-CSF 和 IL-4 刺激, 它们可成熟为有吞噬能力的巨噬

细胞。来源于 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 的单核细胞能吞噬 FITC 标记的乳胶颗粒, 与未转染细胞因子 Fibs 不同。造血细胞因子处理 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 也能产生表达 CD15 的粒细胞; 在形态上不同于单核细胞, 它们具有中性粒细胞, 嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞特征和多核形态(图 4)。如果没有细胞因子处理, $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 细胞虽能保留 CD45 的表达, 但髓系特异性标记会减少, 单核细胞和粒细胞就会缺失。这些结果表明, 细胞因子刺激对于 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 的造血性扩增和成熟是必要的。

细胞因子刺激后, 大约有四分之一的 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 共表达 CD34。与体内来源于 UCB 祖细胞的表达情况相似, $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 能生成集落生成单位(CFUs), 表明它们具有单能和双能祖细胞的粒系和巨噬细胞系增殖发育的潜力。

由于体外具有髓系发育能力, 可将 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 移植到免疫缺陷的 NOD/SCID IL2R γ c-null(NSG)小鼠体内来证实这一潜能。根据 HLA-A/B/C $^+$ 细胞检测, NSG 小鼠体内高达 20% 的造血细胞来自植入的 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 细胞。 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 植入水平可与

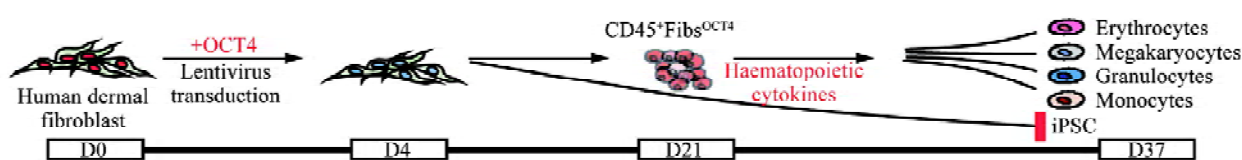


图3 用 OCT4 和造血因子诱导人皮肤成纤维细胞转换为造血细胞的实验流程图(图片来源: *Nature* 2010; 468: 521-6)

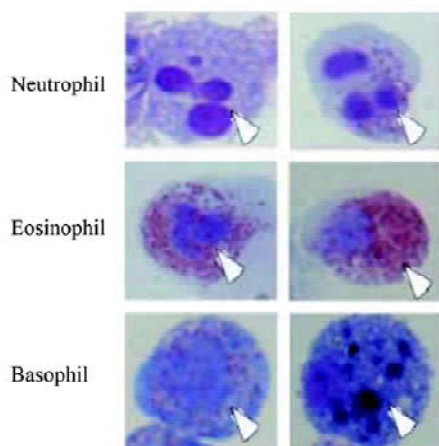


图4 Jeimsa-Wright 染色的粒细胞

图中的细胞来自图3的 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 细胞的诱导(图片来源: *Nature* 2010; 468: 521-6)

UCB祖细胞和MPB祖细胞植入相当。与UCB和MPB细胞相比, NSG 受体显示以髓系表型为主(~41% $\text{CD45}^+ \text{CD14}^+$)。部分移植细胞保持 CFU 启动的潜力, 和人类 UCB 细胞类似。移植 10 周后, NSG 对侧骨上生成造血祖细胞的能力和移植存活虽然很低, 但能证明 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 细胞在体内具有功能。移植的 CD45^+ 细胞只限制 NSG 小鼠的二次移植能力, 这表明他们不具备转化的白血病干细胞特性, 与致瘤的 hPSC 源性细胞比较要安全得多。

总的来说, 这些数据表明: $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 细胞具有造血祖细胞类似的功能, 能够在体外和体内发育成髓系细胞。

上述结果表明 $\text{CD45}^+ \text{Fibs}^{\text{OCT4}}$ 细胞具有髓系造血

功能,是否也能具有红系造血功能呢?这是很自然会想到的问题。在 OCT4 转染时, Fibs 表达红细胞标记 CD71 的比例达到将近 40%。红细胞生成素(EPO)是红细胞早期分化的诱导因子。在 Fib^{OCT4} 培养中加入 EPO, 可使表达 CD71 的 Fibs 数目增加两倍, 血型糖蛋白 A 和成人 β - 球蛋白表达也有增加。CD45⁺ Fibs^{OCT4} 无 EPO 处理时, 只表达 β - 球蛋白的转录本, 而检测不到 β - 球蛋白。不像来自 hPSCs 的造血细胞, 来自 CD45⁺ Fibs^{OCT4} 的造血细胞缺乏胚胎球蛋白表达。EPO 处理的 CD45⁺ Fibs^{OCT4} 表现为原始的和成熟的红细胞(去核)形态。以前研究表明: 红细胞和巨核细胞可能起源于共同的祖细胞。EPO 刺激 CD45⁺ Fibs^{OCT4} 诱导能产生巨核细胞。通过巨核细胞(Mk)-CFU 分析检测, 表明 Mk- 特异性抗原 GPIIb/IIIa(CD41) 存在表达, 而这种类型造血祖细胞在无 EPO 处理 CD45⁺ Fibs^{OCT4} 或对照组 Fibs 中是不表达的。这些结果表明, EPO 处理的诱导机制与原始的(胚胎)造血机制是截然不同的。

上述研究确切表明: 人体不同来源(皮肤或包皮)的成纤维细胞仅用 OCT4 单一因子转染就能转化为造血祖细胞, 而且在不同的造血因子诱导下可向髓系或红系分化。虽然, 这项研究还未涉及到淋巴细胞的分化, 但这种可能性还是存在的, 有待进一步研究。

目前, 利用“重编程”来直接使成纤维细胞或成体细胞转换为其它终末分化细胞已有不少进展, 可以避开或绕过诱导多能干细胞(iPS)这一效率低、周期长、操作技术复杂的环节; 但是, 这种直接转换还是需要外源基因转染, 在临床上的应用与诱导型多能干细胞(iPSCs)同样存在风险; 因为, 外源基因在转染时对宿主细胞基因组的插入位点难于控制, 给基因组造成突变在所难免。对 iPS 的研究中, 已有许多技术和方法避开外源基因直接的使用, 接下来必然也会将这些技术和方法用于细胞的直接“重编程”研究。虽然, 这些技术和方法的转换效率很低, 只要继续努力, 终究会有突破的一天。