

诱导多功能干细胞的影响因素

汤黎娜^{1,2} 张 杨¹ 宋光启¹ 施 维^{2*} 李子义^{1*}

(¹吉林大学畜牧兽医学院动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春130062;

²吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春130023)

摘要 将体细胞诱导为多功能干细胞为人类的再生医学提供了一个全新的研究手段, 从而可以不用损坏胚胎就能获得可用于治疗各种特殊疾病的细胞。本文比较了近年来关于生成诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)的诱导方法及重编程效率, 总结了这些方法的共同点; 另外通过对每个不同试验过程的影响因素进行比较, 归纳了影响iPS细胞重编程过程的几个因素。

关键词 影响因素; 诱导性多能干细胞(iPS); 重编程; 效率

前言

干细胞是一类能自我更新、快速增殖, 并具有多向分化潜能的细胞。根据干细胞分化阶段的不同, 分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)和成体干细胞(adult stem cell, AS细胞)两类。ES细胞具有与早期胚胎细胞相似的结构特征, 有较高的核质比和正常的整倍体核型。如今已成功在体外诱导ES细胞分化成多种成体细胞(如神经细胞、肝细胞、白细胞等), 为治疗人类某些疾病作出了重大的贡献。但是ES细胞的提取必须损坏胚胎, 有违人伦道德。因此, 急需找到一种既能弥补这一缺陷而又具有ES细胞多能性的类ES细胞, 于是诱导性多能干细胞(iPS细胞)就应运而生了。

iPS细胞是指用特定的几种转录因子将体细胞经过重编程诱导生成的诱导性多能干细胞。2006年首次成功获得了小鼠的iPS细胞^[1], 2007年成功地对人类细胞进行了重编程^[2]。由于iPS细胞既能避免免疫排斥, 又不涉及伦理道德问题, 因此具有广泛且重要的临床应用价值。但是iPS细胞系的建立技术尚不成熟, 由于一些未知因素的干扰, 直接重编程过程依然是一个缓慢且低效率的过程。以下是几种可能影响iPS细胞重编程的因素: ①用于重编程的因子的选择; ②运送因子的方法; ③靶细胞的选择; ④因子表达的参数; ⑤生成iPS细胞的培养体系和诱导条件; ⑥识别和鉴定重编程细胞的方法。为解决iPS细胞系建立中存在的问题, 科研人员从多方面改进构建iPS细胞的方法(表1)。本文仅就iPS细胞影响因素

的研究进展作一概述。

1 重编程因子的选择

2006年日本科学家Takahashi等^[1]首次获得iPS细胞的方法是选用24种与维持多功能性相关的基因, 经过层层筛选确定了诱导小鼠胎儿成纤维细胞生成iPS细胞所必须的4个基因, 即*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*。随后进行的实验证实这4个基因能够对小鼠的多种细胞起作用^[3], 同样也适用于猕猴和人类细胞^[4]。

这4个因子的其他家族基因也能够诱导iPS细胞的生成。如*Sox1*和*Sox3*可替代*Sox2*, 但是重编程效率会降低; *Klf2*可替换*Klf4*, *L-Myc*和*N-Myc*也可替换*c-Myc*^[5]。另有报道表明, 不同的因子组合(如*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Lin28*)足以重编程人的成纤维细胞^[6]。

某些细胞类型如果能内源性表达重编程因子就可以在诱导其重编程过程中剔除该因子。比如成纤维细胞可以内源性表达*c-Myc*和*Klf4*, 因此外源性的*c-Myc*在小鼠和人成纤维细胞的重编程中就不是必需的, 但重编程的效率会降低并且时间会延长^[7]。神经干细胞内源性表达*Sox2*和*c-Myc*的量比ES细胞多, 因此用*Oct4/Klf4*或者*Oct4/c-Myc*进行诱导就可

收稿日期: 2010-08-13 接受日期: 2010-10-09

国家重点基础研究发展规划(973计划, No.2009GB41000)资助项目

*通讯作者: Tel: 0431-87836187, E-mail: ziyi@jlu.edu.cn; Tel: 0431-85155216, E-mail: wshi0668@yahoo.com.cn

以完成其重编程^[8]。

近来一些实验证实, 某些小分子和外加因子能够提高重编程过程的效率或者在功能上能够替代某些转录因子。但使用这些小分子物质我们必须谨慎, 因为这些物质的某些特异性功能会影响基因的正常表达, 例如5'氮胞啶可以导致突变^[9], 小鼠DNA甲基化的全面突变会提高畸胎瘤的形成效率^[10]。

2 重编程因子的运输

最初小鼠和人iPS细胞的获得是通过逆转录病毒和慢病毒完成的^[11]。但这些病毒系统由于能够永久地整合到基因组中, 其所诱导形成的iPS细胞的安全性受到质疑。因此为了能够更好地适于再生医学应用的iPS细胞, 就需要研发不发生整合的载体。载体传递和瞬时转染两种方法最先在小鼠细胞重编程中得到了应用并取得了成功^[12], 由此推测, 瞬时转染方法也能应用于人类iPS细胞的诱导。在直接重编程历史上第一个使用的是基于Moloney小鼠

白血病病毒的逆转录病毒载体^[13], 它在ES细胞水平表现沉默。其自我沉默的特点本应是一种优势, 然而整合到基因组的几大缺陷抑制了这些逆转录酶病毒的使用: ①其转染性限制了进行重编程细胞的类型^[14]; ②在iPS细胞诱导过程中逐渐地发生了沉默, 与没发生沉默的病毒方法相比转换效率极低^[15]; ③通过逆转录病毒诱导形成的iPS细胞通常会表达病毒基因^[16], 从而限制了其使用范围。尽管已有由慢病毒诱导iPS细胞的相关报道^[17], 但其在连续基因表达中的分化机制仍不清楚^[18]。

药物诱导慢病毒由于能够瞬时控制, 所以提供了一个更加有效的途径。尽管这些病毒也能够整合到宿主基因组中, 但在理论分析中却有特殊的帮助。在iPS细胞诱导中如果使用整合性病毒, 将会导致基因组插入以至改变基因的结构^[19], 最终在临床相关应用上造成巨大障碍。已有研究通过对iPS细胞相关整合位点的分析发现, 基因组整合对于重编程过程来说并非是必需的。

表1 重编程的不同方法
Table 1 Different re-programming methods

细胞类型 Cell type	重编程的因子 Reprogramming factors	运送因子的方法 Methods of factor delivery	效率 Efficiency	参考文献 References
Mice				
Fibroblasts	O+K+S+M	Retroviral vectors	0.01%~0.05%	[1]
	O+K+S+M	Lentiviruses	0.5%	[21]
	O+K+S+M	Plasmid	0.0001%~0.01%	[22]
	O+K+S+M	PB transposon	N	[23]
	O+K+S+M	Protein mediate	0.002%~0.008%	[24]
	O+K+S	Retroviral vectors	0.001%~0.01%	[7]
	O+K+S+VAP	Retroviral vectors	0.002%~0.008%	[25]
	O+K+Bix+BayK	Retroviral vectors	0.007%~0.02%	[26]
	O+K+M+RepSox	Retroviral vectors	~1%	[27]
Neural progenitor cells	O+K+S+M;O+K+S	Retroviral vectors	0.1%~5%	[8,31]
	O+K;O+M;O	Retroviral vectors	0.1%~0.2%	[28]
Stomach cells	O+K+S+M	Retroviral vectors	0.5%~3%	[3]
B lymphocytes	O+K+S+M	Lentiviruses	0.01%~0.1%	[26]
Human				
Human fibroblasts	O+K+S+M;	Retroviral vectors	0.001%~1%	[2,16,20]
	O+K+S+M+N;			
	O+K+S;O+S+VAP			
Adipose stem cells	O+S+N+L	Lentiviruses	0.01%~1%	[30]
Amniocyte	O+K+S+M	Protein mediate	0.001%	[31]
	O+S+L+N	mRNA	0.05%	[32]
	O+K+S+M	Lentiviruses	0.2%	[33]
	O+S+L+N	Annulet vectors	0.005%	[34]
	O+K+S+M	Retroviral vectors	1.525%	[35]

O: Oct4; S: Sox2; M: c-Myc; K: Klf4.

3 重编程细胞类型的选择

在人和小鼠上首次进行重编程时所选用的是成纤维细胞。小鼠细胞的核转移实验^[20]和人与小鼠的细胞融合实验证实,成熟的成纤维细胞能够对重编程起重要作用。现在,成纤维细胞的诱导技术已越来越简便。除了成纤维细胞,小鼠其他类型的细胞如胃细胞^[3]、肝脏细胞、胰脏 β 细胞、淋巴细胞和神经干细胞^[8],还有人类的角蛋白细胞^[36]、脂肪干细胞^[35]等都被成功地进行了重编程。

在选择靶细胞时,必须要考虑以下几点:①要选用易被转染的细胞;②细胞的年龄和来源;③细胞的繁殖能力。老龄细胞或已经传了几代的细胞会阻碍生殖能力,从而降低iPS细胞的临床治疗效果;而从器官中获得的原代细胞的DNA容易损伤,如易于聚集UV诱导突变的皮肤细胞就不适合作为临床研究对象。因此,尽管成纤维细胞是研究重编程理论学分析基础性研究中采用的细胞类型,但从治疗目的出发,仍需考虑诱导出来的iPS细胞必须容易获得,含有较少的遗传畸变,并且通过瞬时方法容易进行重编程。

4 重编程因子的表达参数

为缩短iPS细胞重编程的时间,对某些关键数据已经进行了试验测定,如小鼠成纤维细胞的诱导时间至少需要8~12 d,而人的角化细胞只需大约10 d左右^[37]。尽管延长外源性因子的转染时间会增强克隆的增殖,但在多能性水平上持续表达可能会有反作用。因此最佳的诱导方针就是外源基因应在iPS细胞一出现就结束表达。

精确检测重编程过程中的表达水平相当困难。探明重编程因子传递的变异及转化效率低下等的种种原因,需要重新分析每种因子单独对某种细胞重编程生成多能性细胞的影响。总之,因子表达的最佳水平是重编程过程的重中之重。例如仅用3种因子(Oct4、Klf4、c-Myc)将神经干细胞转化为iPS细胞的过程具有很高的效率,这说明外源Sox2的表达不是必须的,甚至对转化效率是有害的。

5 培养体系和诱导条件

人和小鼠的iPS细胞的生成均是在ES细胞的培养条件下完成的^[1,2],至今尚未建立新的培养条件,一旦建立无培养基诱导iPS细胞的方法,iPS细胞将是

临床治疗的最好原材料。现有的诱导培养基均需要成纤维细胞分泌的物质来维持自身的生长,尤其是人的ES细胞。小鼠的ES细胞能在无饲养层、不添加生长因子的明胶上生长,所以小鼠的iPS细胞也能在无饲养层的培养基上生长。以往认为人iPS细胞在无饲养层细胞的培养基条件下的诱导不会成功,但最新研究表明,当用脂肪干细胞进行诱导时,可在人工基底膜上生成iPS细胞,从而减少了杂细胞干扰的几率,这无疑是一个创新^[35]。

6 识别和鉴定重编程细胞的方法

iPS细胞克隆株的筛选主要是根据ES细胞的独有特征进行形态学判断。小鼠的ES细胞克隆可根据其自身的特殊标志加以区分^[21],如外形光滑且紧密,边缘界限清晰;人的ES细胞克隆是一个鹅卵石的外形,具有显著而又独特的外形^[20]。在这两个物种细胞重编程的过程中,生成的克隆在形态学上有渐进性的改变。值得一提的是,在诱导人的成纤维细胞重编程过程中,也会形成一些在形态学上类似于ES细胞但不具有多功能性的克隆。这些克隆是iPS细胞的错误形态,它们与iPS细胞有区别,其外表松散呈颗粒状,并且在重编程起始阶段就开始形成。某些辅助性标记方法也用来识别iPS细胞,例如在小鼠的成纤维细胞重编程过程中分离Thy-1-SSEA阳性细胞有助于提高iPS细胞的形成效率,并且对人ES细胞表面特殊抗原Tra-1-81的染色能辅助鉴别哪些是由成纤维细胞产生的iPS细胞克隆。

小鼠的iPS细胞/ES细胞能阻止单个细胞的分化,并且新生克隆能立刻开始进行酶分解作用,从而简化了形成细胞系的过程。在细胞能够用于消化酶解离之前必须先传代。因为人iPS细胞/ES细胞极易分化,尤其是在开始的前几代细胞中,因此剔除已分化细胞以阻止提前分化尤为必要。

7 结语

将体细胞成功诱导为多功能性细胞具有跨时代的意义,iPS细胞的诞生促进了再生医学领域的发展,为研究细胞生命的传递提供了一个强有力的工具,也为人类顽固疾病的治疗带来了希望。但该技术真正用于临床治疗还有相当长的路要走,如何提高iPS细胞生成的效率?怎样解决其临床应用的安全性?重编程过程中转录因子的调控机制是什么?

这些问题都仍需进一步深入研究。

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, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007b; 131(5): 861-72.
- 3 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321(5889): 699-702.
- 4 Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 587-90.
- 5 Blomloeh R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 245-7.
- 6 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 7 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- 8 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.
- 9 Jackson-Grusby L, Laird PW, Magge SN, Moeller BJ, Jaenisch R. Mutagenicity of 5-aza-2'-deoxycytidine is mediated by the mammalian DNA methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(9): 4681-5.
- 10 Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 2003; 300(5618): 489-92.
- 11 Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protocols* 2006; 1(1): 241-5.
- 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 Jähner D, Stuhlmann H, Stewart CL, Harbers K, Löhler J, Simon I, *et al.* De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* 1982; 298(5875): 623-8.
- 14 Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 1992; 12(1): 4239-42.
- 15 Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2008b; 2(3): 230-40.
- 16 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218-21.
- 17 Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, *et al.* Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2): 151-9.
- 18 Blomloeh R, Venere M, Yen J, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 245-7.
- 19 Kustikova O, Fehse B, Modlich U, Yang M, Düllmann J, Kamino K, *et al.* Clonal dominance of hematopoietic stem cells triggered by retroviral gene marking. *Science* 2005; 308(5725): 1171-4.
- 20 Wakayama T, Perry AC, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394(6691): 369-74.
- 21 Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hoeliedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky K. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 2009; 27(3): 543-9.
- 22 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322(5903): 949-53.
- 23 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämläinen R, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.
- 24 Zhou H, Wu S, Joo JY. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(5): 381-4.
- 25 Huangfu D, Maehr R, Guo W. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008; 26(7): 795-7.
- 26 Shi Y, Deshpande C, Do JT, Hahm HS, Scholer HR. 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.
- 27 Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, *et al.* A small-molecule inhibitor of Tgfbeta signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5): 491-503.
- 28 Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araújo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; 136(3): 411-9.
- 29 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- 30 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1269-75.
- 31 Ebert AD, Mattis VB, Lanson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(7227): 277-80.

- 32 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.
- 33 Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cell by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-6.
- 34 Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(1): 189-93.
- 35 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.
- 36 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26(11): 1276-84.

Impacting Factors for Induced Pluripotent Stem Cells

Li-Na Tang^{1,2}, Yang Zhang¹, Guang-Qi Song¹, Wei Shi^{2*}, Zi-Yi Li^{1*}

(¹Jilin Province Key Laboratory of Animal Embryo Engineering, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University Changchun 130062, China; ²Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, the Ministry of Education, Jilin University Changchun 130032, China)

Abstract Direct reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) provides an invaluable resource for regenerative medicine, enabling the generation of patient-specific cells of any lineage without the use of embryonic material. We compared the currently reported protocols, identified the essential steps common to these methods, and summarized several factors that affect iPS cells reprogramming process, with an emphasis on standardization of certain parameters for accurate comparison between independent experiments.

Key words influential factor; iPS; reprogramming; efficiency

Received: August 13, 2010 Accepted: October 9, 2010

This work was supported by National Program on Key Basic Research Project(973 Program)(No.2009GB41000)

*Corresponding author. Tel: 86-431-87836187, E-mail: ziyi@jlu.edu.cn; Tel: 86-431-85155216, E-mail: wshi0668@yahoo.com.cn