

特约综述

多能干细胞研究进展

金颖*

(中国科学院上海生命科学研究院/上海交通大学医学院健康科学研究所, 上海 200025)

摘要 多能性干细胞是具有长期自我更新并产生机体内任何种类细胞潜能的特殊细胞群体。一般来讲, 多能性干细胞包括胚胎干细胞、胚胎生殖干细胞和胚胎肿瘤干细胞。2006年, 分化的体细胞被直接重编程而产生了一种新的多能干细胞, 称为诱导性多能干细胞。多能干细胞对于再生医学、药物筛选、疾病模型及其发育生物学的研究都有重要意义。多能干细胞研究, 尤其是对诱导性多能干细胞的研究发展迅猛, 本文对该领域的进展进行简要的综述。

关键词 多能干细胞; 胚胎干细胞; 诱导性多能干细胞; 重编程

1 干细胞的定义、分类及其研究价值

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的特殊细胞类群。研究表明, 这类细胞存在于发育不同阶段的动物体内的多数组织和器官中^[1]。在体外适当的培养条件下, 干细胞可以被大量扩增和分化为具有特定功能的细胞。因此, 干细胞可以为临床疾病治疗提供移植所需要的细胞。同时, 由于药物筛选和安全性检验不可以直接在人体进行, 人的干细胞也成为大规模的新药筛选和药物研究的理想模型。来源于不同发育阶段和不同组织器官的干细胞在基因表达调控、表观遗传状态、体外增殖和分化潜能等方面都存在很大的差异。一般来讲, 根据干细胞增殖能力和分化潜能的不同, 可以把干细胞分为具有无限增殖和分化潜能的多能干细胞(pluripotent stem cells)和增殖和分化能力有限的组织干细胞或成体干细胞(tissue stem cells or adult stem cells)。多能干细胞包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells), 胚胎生殖干细胞(embryonic germ cells, EG cells), 胚胎肿瘤细胞(embryonal carcinoma cells, EC cells)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)等。这些细胞具有在体外特定的培养条件下无限增殖和分化为机体内任何种类细胞的潜能, 包括生殖细胞。因此, 这些细胞可以为研究生物学基本问题 and 治疗疑难杂症提供无限的细胞来源。

2 干细胞的获取及其研究历史

多能干细胞最早是在畸胎瘤(teratocarcinoma)中发现和研究的^[2]。畸胎瘤含有起源于胚胎三个胚层

(外胚层, 中胚层和内胚层)的多种细胞和组织, 比如皮肤、神经上皮、毛发、肠管、软骨和肌肉等。这些分化的细胞来自于畸胎瘤内的EC细胞。体外培养的EC细胞系就是从这些肿瘤细胞中分离出来的。EG细胞是胎儿原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)在体外建系培养得到的。从胎儿生殖腺分离的PGC在含有血清和某些特定生长因子的培养液及饲养层细胞存在的条件下就会形成与ES细胞相似的细胞克隆。人的EG细胞是1998年John Gearhart博士从5~9周流产胎儿的原始生殖细胞中鉴定并分离培养成功的^[3]。ES细胞是动物早期发育囊胚期内细胞团(inner cell mass, ICM)细胞在体外特定培养条件下获得的永生细胞^[4]。虽然ES细胞与内细胞团的细胞有相似的特点, 但是ES细胞不等同于内细胞团的细胞。内细胞团内全能性的细胞只暂短地存在于胚胎发育的早期, 而ES细胞通过适应体外的培养环境可以长期传代。小鼠的ES细胞早在上个世纪八十年代初就被成功地建立, 为研究动物早期发育过程和基因的功能做出不可替代的贡献^[5,6]。1998年, 美国科学家James Thomson博士成功地利用体外受精试管婴儿剩余胚胎, 从囊胚期内细胞团的细胞中分离培养了人的胚胎干细胞^[7]。近10年的研究表明, 人ES细胞和小鼠ES细胞有许多共性, 但也有许多不同的特性^[8]。比如, 它们都表达未分化ES细胞特异性的转录因子(Oct4和Nanog等), 它们都能分化为体内任何种类的细胞。但是, 它们赖以生存的生长因子有所不同, 对一些信号通路调控的反应也有差异。

* 通讯作者。Tel: 021-63852591, E-mail: yjin@sibs.ac.cn

3 科学家在干细胞临床应用上的探索

科学家们对人胚胎干细胞在体外的培养和分化条件进行了广泛的研究。实现了人胚胎干细胞的无饲养层培养和在成分明确的无动物成分的培养液中建立人的胚胎干细胞系。成功地在体外将人的胚胎干细胞分化为神经元,尤其是具有功能的多巴胺神经元及少突胶质和星状胶质细胞、肝细胞、内皮细胞、心肌细胞、胰腺 β 细胞和造血细胞等。然而,干细胞移植中的免疫排斥问题一直未得到解决。科学家们希望通过建立人核转移胚胎干细胞(human nuclear transplantation ES cells, hntES cells),从根本上解决异体细胞移植的免疫排斥问题。其方法是将体细胞的细胞核转移到去核的未受精卵母细胞产生重组胚,建立人胚胎干细胞系。从理论上讲,这种胚胎干细胞所表达的表面抗原应与细胞核提供者基本一致,这就是治疗性克隆的概念。但是,由于卵母细胞内的线粒体中也含有一定的遗传物质,也会在一定程度上影响所建立的胚胎干细胞的特性。目前许多动物的核移植胚胎干细胞系都已被建立。2007年非人灵长类动物的核移植胚胎干细胞建立成功^[9]。但是,体细胞核转移的低效率和人卵母细胞的缺乏及伦理问题的争议等限制使人的核移植胚胎干细胞系至今尚无成功报道。

4 诱导性多能干细胞的建立及其发展

2006,日本科学家 Takahashi 和 Yamanaka^[10]发表了使整个科学界为之振奋的消息:用4种转录因子(Oct4, Sox2, Klf4 和 c-Myc)可以在体外直接诱导小鼠的皮肤成纤维体细胞成为具有像胚胎干细胞一样有多发育潜能的多能干细胞。这种细胞被称为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells)。2007年,美国 Whitehead 研究所 Jaenisch 研究组重复并改进了 Yamanaka 的 iPS 细胞工作^[11]。他们建立的小鼠 iPS 细胞不仅在体外培养条件下可以无限扩增和分化为体内的任何种类细胞,并且可以在注入囊胚后产生嵌合体 and 生殖细胞^[12]。同年, Yamanaka 和美国 Thomson 研究组分别用特定的因子诱导人类成纤维细胞成为 iPS 细胞^[13]。同年,美国 Jaenisch 的研究组还利用患有镰刀状贫血小鼠的成纤维细胞建立了 iPS 细胞,并通过基因打靶修正疾病基因^[11]。然后,将含有正确基因的 iPS 细胞诱导分化为血液干细胞细胞并移植回患病小鼠,使小鼠的贫血症状得到改善。这一成果证明 iPS 细胞具有用于疾病治疗的潜

能。iPS 细胞的分离培养成功是干细胞研究乃至生命科学领域的里程碑。它首次证明可以用已知的几种因子在体外逆转已经分化的细胞,使之成为具有发育全能性的细胞。这种体细胞的直接重编程使我们有可能建立患者特异的 iPS 细胞,诱导其分化用于细胞治疗,解决异体移植的免疫排斥问题并实现因人而异的药物安全性和毒性检验;也可以建立疾病特异的 iPS 细胞,用于研究疾病的发生机理和治疗途径;此外建立 iPS 细胞系还避开了建立人胚胎干细胞所涉及的伦理障碍。

但是,以上介绍的 iPS 细胞多数是通过逆转录或慢病毒把特定的因子导入细胞内,具有诱发肿瘤的危险。Yamanaka 研究组^[13]发现,通过逆转录病毒介导4种转录因子产生的 iPS 细胞在嵌合体内有较高频率的肿瘤发生。近几年来,科学家们在努力研究新的基因转导技术,以建立更加安全和适合于临床应用的 iPS 细胞系。比如, Yamanaka 的研究组^[13]尝试用非病毒载体反复转染小鼠成纤维细胞,美国麻省总医院研究组^[14]应用非整合性腺病毒导入4种转录因子以建立 iPS 细胞。此外,美国哈佛医学院 Melton 博士研究组^[15]仅用 Oct4 和 Sox2 两种转录因子结合应用小分子化合物诱导人原代培养的成纤维细胞成为 iPS 细胞。最近,新的基因表达载体层出不穷,比如:episomal 超表达载体^[7]、把4种转录因子组装在同一表达载体^[16]、诱导性表达载体^[17,18]、可被切除的表达载体^[19]及含有转座序列的载体^[20]等等。还有研究应用 Oct4 和 Klf4 两种表达载体结合两种小分子化合物诱导小鼠成纤维细胞成为 iPS 细胞^[13]。这些手段在不同程度上提高了 iPS 细胞的安全性,但还是有外源 DNA 的导入。2009年4月美国 Scripps 研究所 Ding 研究组^[21]实现利用体外表达的4种转录因子的重组蛋白结合应用组蛋白去乙酰酶抑制剂成功地建立小鼠 iPS 细胞系。这是首次通过非基因改造的方法实现体细胞重编程。以上这些方法产生 iPS 细胞虽然肿瘤发生率低,但是建立 iPS 细胞的效率低或所需的时间长。研究表明,不同种类的细胞对诱导重编程因子的反应程度及所需诱导时间有很大的差别。因此,除重编程因子导入技术的优化外,选择临床上取材方便和容易被重编程的细胞类型也是一个需要考虑的因素。目前,科学家们已经在成纤维细胞以外的若干类型的小鼠细胞进行了尝试。比如,胃和肝脏细胞^[13]、神经干细胞^[22]、胰腺 β 细胞^[23]、终末

分化的 B 淋巴细胞^[17]等。试验结果显示由胃和肝细胞产生的 iPS 细胞的成瘤性明显低于皮肤成纤维细胞来源的 iPS 细胞^[13]。德国 Schooler 研究组^[24]利用神经干细胞本身表达 Sox2 和 c-Myc 的特点, 仅用 Oct4 和 Klf4 使小鼠神经干细胞成为 iPS 细胞。最近, 该研究组实现了只用 Oct4 一种表达载体建立小鼠神经干细胞来源的 iPS 细胞^[25]。建立人 iPS 细胞的报道少于小鼠细胞, 除成纤维细胞外, 人的血液 CD34⁺ 细胞^[26]和皮肤角质细胞^[27]有报道被成功地诱导成为 iPS 细胞。此外, 科学家们还建立了疾病特异性或患者特异性的 iPS 细胞系^[7,28]。这些细胞系的建立为研究这些疾病的发病机制和发现新的治疗方法提供了新的途径。由此可见, 短短 2~3 年来, iPS 细胞研究领域的发展突飞猛进, 已经成为细胞生物学领域乃至生命科学领域最受关注的研究。但是, 要真正能在临床上应用 iPS 细胞还有很长的路。可以预见在未来的 5~10 年内, iPS 细胞相关的研究将继续是生命科学领域的热点。尤其应该重视 iPS 细胞形成的规律和关键转录因子诱导体细胞重编程的分子机制, 以实现 iPS 细胞研究和应用的指导。此外, 值得指出的是, iPS 细胞的成功分离是建立在在人们对胚胎干细胞的广泛研究基础上。今后, iPS 细胞的应用还依赖于其体外的扩增和定向分化及其体内的移植。这些都离不开对胚胎干细胞的研究。因此, 胚胎干细胞的研究不仅不能被淘汰, 而是要更加被重视。

5 我国干细胞研究的现状

我国政府高度重视干细胞的研究。科技部和自然科学基金委都启动了多项干细胞研究课题。各地方政府也投入大量资金用于干细胞的研究。上海市政府已连续启动 4 次干细胞研究重大项目。在这些举措的引导下, 我国各大城市和大专院校相继建立了干细胞研究队伍, 并取得一些可喜的成绩。我们研究组自 2002 年来一直从事胚胎干细胞自我更新和发育全能性的研究。首先, 我们建立了正常受精及孤雌激活胚胎来源的小鼠 ES 细胞系^[29], 大鼠胚胎干细胞样的细胞系^[30], 及在胚胎干细胞进行基因改造的技术平台^[29], 为体外研究胚胎干细胞细胞增殖和分化的分子调控奠定了良好的基础; 此外, 与瑞金医院辅助生殖中心合作建立了稳定的人胚胎干细胞系建系平台^[31]。目前, 已建立 8 株人胚胎干细胞系。其中三株是在无动物成分的培养条件下建立的。所建立的胚胎干细胞系已经并将继续无偿提供给国内外实验

室用于科学研究使用。最近, 在建立小鼠和人 iPS 细胞方面也取得了可喜的进展。建立了具有种系遗传潜能的小鼠 iPS 系^[32]和多株能形成畸胎瘤的人 iPS 细胞系^[21], 并已经开始无偿提供给科研单位。利用这些细胞系, 我们建立了胚胎干细胞水平研究蛋白质-蛋白质及蛋白质-DNA 之间相互作用的技术平台。利用亲和纯化及酵母双杂交等技术筛选出多个与胚胎干细胞全能性因子 Oct4 相互作用的蛋白质。比如, 首先发现 Oct4 可以被泛素修饰, Wwp2 是 Oct4 的 E3 泛素化连接酶^[33]。证明该泛素连接酶对胚胎干细胞中的 Oct4 蛋白水平有调控作用^[34]。同时, 研究发现 Wwp2 还可以对 RNA 聚合酶 II 的大亚基进行泛素化修饰^[9]。此外, 我们的研究还揭示了 Oct4 受另外一种泛素样修饰分子(SUMO-1)的调控, 并证明这两种蛋白质修饰分子以互相拮抗的方式共同调节 Oct4 在胚胎干细胞内的蛋白水平^[29]。这些研究为阐明 Oct4 如何维持胚胎干细胞的特性提供了新的思路。除了对 Oct4 的研究外, 我们对与胚胎干细胞自我更新调控相关的其它基因也开展了探索。比如, 发现共同激活因子 p300 对胚胎干细胞分化过程中另外一个重要转录因子 Nanog 的表达是必需的^[35]。首次报道 PARP1 通过对转录因子 Sox2 的翻译后修饰调控胚胎干细胞分化过程中 Fgf4 的表达和细胞的生存^[36]。我们还发现一些核仁蛋白对胚胎干细胞自我更新的维持是必不可少的^[37]。此外, 利用染色质免疫沉淀等方法我们还发现并研究了一些 Oct4 的新的下游基因及调控胚胎干细胞发育全能性的新的信号通路。目前, 我们在继续深入探索胚胎干细胞自我更新和多发育潜能的分子机制的同时, 拓展胚胎干细胞向神经细胞分化的研究。我们希望在取得科学研究成果的同时能培养和锻炼优秀的研究生和青年科研人员, 建立一支有活力有实力的干细胞研究队伍, 与国内外其他研究队伍合作一起向新的更高的目标迈进。

6 小结及展望

干细胞具有自我更新和分化为多种类型细胞的潜能, 这些特征使其不仅为基础研究和药物筛选提供了理想的细胞模型, 更成为细胞、组织甚至器官移植供体的理想来源, 有望为帕金森病、糖尿病等疑难病症提供有效的根治手段。所以干细胞的研究具有很大的发展潜力和应用前景。经过科学家多年的研究, 成功建立了多种多能干细胞的细胞系, 并在多

能干细胞的临床应用方面进行了不懈的探索。尤其是近年来诱导性多能干细胞的建立,解决了免疫排斥和与人胚胎干细胞建系相关的伦理问题,使得多能干细胞距离临床应用又进了一步。但是,干细胞研究领域还有许多问题有待研究和解决,比如如何高效获得安全的人诱导性多能干细胞,如何定向诱导多能干细胞向某一特定类型的细胞分化并有效地将细胞移植入患者体内实现对疾病的治疗作用,等。这些问题的解决有待于从根本上阐明体细胞重编程、多能干细胞自我更新和定向分化的分子调控机制,同时也需要基础研究人员与临床医务工作者的密切合作。在过去的十年中,我国政府对干细胞研究的大力支持和宏观调控使我国干细胞研究领域的发展非常迅速,科学家在这一领域取得了很好的研究成果,相信随着国际交流的日益加强,我国对于胚胎干细胞的研究将在国际上更加具有竞争力,并最终实现基础研究和临床应用的结合,改善人类的健康状况。

参考文献(References)

- [1] Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine, *Stem Cell Rev*, 2008, 4(1): 3-11
- [2] Solter D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research, *Nat Rev Genet*, 2006, 7(4): 319-327
- [3] Shambloot MJ, Axelman J, Wang S, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13726-13731
- [4] Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst, *Stem Cells*, 2001, 19(6): 477-482
- [5] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78(12): 7634-7638
- [6] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 1981, 292(5819): 154-156
- [7] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient, *Nature*, 2009, 457(7227): 277-280
- [8] Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells, *Dev Biol*, 2004, 275(2): 269-286
- [9] Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer, *Nature*, 2007, 450(7169): 497-502
- [10] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 2006, 126(4): 663-676
- [11] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin, *Science*, 2007, 318(5858): 1920-1923
- [12] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution, *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70
- [13] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells, *Science*, 2008, 321(5889): 699-702
- [14] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration, *Science*, 2008, 322(5903): 945-949
- [15] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2, *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1269-1275
- [16] Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(1): 157-162
- [17] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency, *Cell*, 2008, 133(2): 250-264
- [18] Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, et al. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 340-345
- [19] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors, *Cell*, 2009, 136(5): 964-977
- [20] Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors, *Nature*, 2009, 458(7239): 771-775
- [21] Li C, Zhou J, Shi G, et al. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells, *Hum Mol Genet*, 2009, Epub ahead of print
- [22] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors, *Nature*, 2008, 454(7204): 646-650
- [23] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells, *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-894
- [24] Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression, *Stem Cells*, 2008, 26(10): 2467-2474
- [25] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells, *Cell*, 2009, 136(3): 411-419
- [26] Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood, *Blood*, 2009, 113(22): 5476-5479
- [27] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes, *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1276-1284
- [28] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells, *Cell*, 2008, 134(5): 877-886
- [29] Jiang H, Sun B, Wang W, et al. Activation of paternally expressed imprinted genes in newly derived germline-competent mouse parthenogenetic embryonic stem cell lines, *Cell Res*, 2007, 17(9): 792-803
- [30] Vives J, Sasajala P, Chang KH, et al. A mouse model for tracking nigrostriatal dopamine neuron axon growth, *Genesis*, 2008, 46(3): 125-131
- [31] Sun BW, Yang AC, Feng Y, et al. Temporal and parental-

- specific expression of imprinted genes in a newly derived Chinese human embryonic stem cell line and embryoid bodies, *Hum Mol Genet*, 2006, 15(1): 65-75
- [32] Li C, Yu H, Ma Y, *et al.* Germline-competent mouse-induced pluripotent stem cell lines generated on human fibroblasts without exogenous leukemia inhibitory factor, *PLoS One*, 2009, 4(8): e6724
- [33] Xu HM, Liao B, Zhang QJ, *et al.* Wwp2, an E3 ubiquitin ligase that targets transcription factor Oct-4 for ubiquitination, *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23495-23503
- [34] Xu H, Wang W, Li C, *et al.* WWP2 promotes degradation of transcription factor OCT4 in human embryonic stem cells, *Cell Res*, 2009, 19(5): 561-573
- [35] Zhong X, Jin Y. Critical roles of coactivator p300 in mouse embryonic stem cell differentiation and Nanog expression, *J Biol Chem*, 2009, 284(14): 9168-9175
- [36] Gao F, Kwon SW, Zhao Y, *et al.* PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation, *J Biol Chem*, 2009, 284(33): 22263-22273
- [37] Li H, Wang B, Yang A, *et al.* Ly-1 antibody reactive clone is an important nucleolar protein for control of self-renewal and differentiation in embryonic stem cells, *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1244-1254

Research Progress in Pluripotent Stem Cells

Yin Jin*

(Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences & Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract Pluripotent stem cells belong to an unique population of cells, which can self-renew indefinitely and have potential to give rise to any cell types in an organism. Generally, pluripotent stem cells include embryonic stem cells (ESCs), embryonic germ cells (EGCs), and embryonal carcinoma cells (ECCs). In the year of 2006, a new type of pluripotent stem cells, induced pluripotent stem cells, is established by direct reprogramming of differentiated somatic cells. The unique properties of the pluripotent stem cells make them attractive in regenerative medicine, drug screening, disease modeling as well as study of developmental biology. The research in the field of pluripotent stem cells, in particular, of induced pluripotent stem cells, has progressed rapidly and will be briefly reviewed in this article.

Key words pluripotent stem cells; embryonic stem cells; induced pluripotent stem cells; reprogramming

Corresponding author. Tel: 86-21-63852591; E-mail: yjin@sibs.ac.cn