

诱导性多潜能干细胞的研究进展

萨日娜¹ 李喜和^{1,2} 李荣凤^{1*}

¹ 内蒙古大学生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021;

² 内蒙古蒙牛繁育生物技术股份有限公司, 内蒙古呼和浩特市和林格尔县盛乐经济园区, 011517)

摘要 作为生命科学界一大热点领域的干细胞研究一直备受关注, 而诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, 简称 iPSC 或 iPS 细胞)的产生具有里程碑的意义。从 2006、2007 年日本美国科学家先后发表对小鼠与人诱导性多潜能干细胞的研究成果至今, 短短三年时间, iPS 细胞的研究领域以惊人的速度和影响范围发展, 又有了很多新的进展与突破, 并荣登 2007 年 Nature Science times 年度十大科学成果突破榜及 2008 年 Science 年度十大科学成果突破榜榜首。本文概述了诱导性多潜能干细胞的研究背景、研究方法和进展、在哺乳动物中的研究范围和应用现状, 最后提出了展望和有待解决的问题, 以期诱导性多潜能干细胞研究者进行更深入的研究提供一定的借鉴。

关键词 诱导性多潜能干细胞; 哺乳动物; 研究进展

前言

干细胞分为成体干细胞(adult stem cells, ASC, AS 细胞)和胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC, ES 细胞)。胚胎干细胞是从囊胚内细胞团中分离得到的一种二倍体细胞, 从理论上讲具有发育和分化成为机体内几乎所有组织细胞类型的潜能, 从而构成机体各种复杂的组织器官。ES 细胞因其神奇的全能分化能力而被医学界称为“万能细胞”, 但 ES 细胞的研究一直存在激烈的伦理学争论。因此, 一直以来人们进行了大量研究, 试图找到一种方法将已丧失分化全能性的成体细胞恢复全能性, 直接转化为多能干细胞。随着 2006 年日本 Yamanaka 研究小组发表对诱导性多潜能干细胞的相关研究成果在生命科学领域引起的轰动, 国内外众多学者纷纷聚焦 iPS 细胞, 先后分别在小鼠、人类、大鼠、恒河猴等哺乳动物中通过体细胞体外基因转染技术, 将不同组合的转录因子转入已分化的细胞, 经筛选培养建立诱导性多潜能干细胞系。它们具有类似 ES 细胞的功能, 可望用于临床疾病的治疗及药物研究。目前通过已分化体细胞的重新编程来直接转化为诱导性多潜能干细胞的设想已初步实现并日趋成熟完善。生成 iPS 细胞所提供的新思路、新技术和新方法具有重大理论意义和实用价值。与胚胎干细胞研究相比, 体细胞重编程技术可以为更多患者提供自体特异性多能干细胞, 因而, 病人将能轻易地获得与自己完全适配的移植细胞、组织或器官, 不会产生排异反应。血细

胞、脑细胞、神经、骨骼和内脏、皮肤等都将可以更换或移植, 这将为白血病、帕金森氏症、糖尿病、心脏病和癌症等疾病的患者增添生的希望。

1 iPS 细胞的生成背景

哺乳动物的胚胎发生具有严格的时间调控, 然而发育过程是由表观遗传学而非遗传学本身调控, 因此理论上分化过程是可逆的。自然条件下重编程发生在受精后, 高度分化的生殖细胞核被卵母细胞质重编程为全能的合子细胞核。目前体细胞重编程为多能干细胞主要通过四种手段: (1)将体细胞移植入去核卵母细胞, 核移植完成后, 核重编程立即开始进行, 其过程包括染色体结构重建、DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、印记基因表达、端粒长度恢复、x 染色体失活等^[1]。“多莉”的克隆证明已分化的哺乳动物细胞核可以被卵细胞中存在的转录因子重编程为未分化的状态; (2)将体细胞与胚胎干细胞、胚胎生殖干细胞等多潜能细胞融合使其处于 ES 细胞特有的成分中, 或是将分化的体细胞在卵细胞、胚胎干细胞或多潜能癌细胞的抽提物中孵育后体细胞表达多潜能因子, 引出一些核功能的重编程以及相应的 DNA

收稿日期: 2009-12-07 接受日期: 2010-08-26

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No.2009AA10Z111)和内蒙古自治区自然科学基金(No.2009ZD02)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0471-4992443, Fax: 0471-4995071, E-mail: lirf01@yahoo.com.cn

甲基化修饰、组蛋白翻译后修饰,说明ES细胞中某些因子能赋予体细胞核多能性^[2,3]。人们猜测这些因子在维持ES细胞未分化特性以及诱导体细胞多潜能性中都起了重要的作用,但是关于这些因子及其作用机制还知之甚少;(3)对于睾丸精原干细胞还可以通过使用特殊培养条件使其重编程为多能干细胞^[4,5];(4)近年来在干细胞的研究热潮中很多科学家将注意力放在如何在体外通过简单外源转录因子组合,甚至只是利用一些重组蛋白或其他小分子,在已分化的细胞中过表达转录因子而直接诱导多能干细胞生成,即诱导性多潜能干细胞,并且已经取得了很大的进展。

2 iPS细胞的研究方法及进展

2006年,Takahashi等^[6]通过巧妙的实验设计,从24个候选基因中通过系统的排除过程,先删减到10个基因,从这10个基因中观察除去哪个对细胞克隆数影响最大而最终筛选出4个与胚胎干细胞多能性更为密切相关的基因——Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4,用逆转录病毒将4个基因转入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)和成体鼠尾成纤维细胞(tail tip fibroblast, TTF),置于含G418的ES细胞培养基中,与STO滋养层细胞共培养。而MEF细胞已事先通过同源重组将抗新霉素基因neo与 β 半乳糖苷酶融合插入多能基因Fbx15处,用G418筛选时,只有被诱导为多能干细胞的克隆因Fbx15被激活,表达新霉素抗性基因而能够存活,因此成功地将原成纤维细胞重编程为具有胚胎干细胞多能性的细胞。但将此多潜能干细胞注射到囊胚中,只得到一个13.5天的嵌合体胚胎,没有支持胚胎全程发育。并且存在内源性的多潜能基因Oct4和Nanog的表观状态不完全重编程的问题。尽管Takahashi的研究获得的iPS细胞在形态、增殖、表面标记等方面与ES细胞相似,是多潜能的,但与ES细胞还是不相同的,不具备ES细胞的全部特性,主要表现在:(1)内源性的多潜能基因的表观状态是不完全的重编程,增加了关于多潜能状态稳定性的问题;(2)iPS细胞与ES细胞的基因表达、DNA甲基化模式有很大的不同;(3)因为四个转录因子是通过逆转录病毒载体来转导的,外源基因的随机插入能引发致癌基因的活性或抑制抑癌基因的活性,也可能因为插入位置与位点数不定而改变阅读框从而影响其他正常基因的表达,而且重编程过程中外源基因的逆转录活性有可能重新激活,带来很大的不安全性;(4)为了便于筛选而引入抗性基

因使供体细胞发生了遗传修饰;(5)体细胞诱导成功率仅在 10^{-3} 左右,因而导致了iPS细胞与共培养细胞分离的困难。鉴于以上问题,随后在此基础上科学家们展开了一系列改进实验,iPS细胞的研究热潮持续高涨,并取得了多项令人瞩目的进展。

2.1 筛选标记的改进

2007年7月,Yamanaka研究小组^[7]进一步用ES细胞特异表达的Nanog代替Fbx15进行筛选,得到Nanog表达阳性的iPS细胞系。他们猜测之前不完全的重编程可能是由于Fbx15表达筛选造成的。因为Fbx15是ES特异性表达的基因,但它不是ES细胞维持多能性所必需的,故筛选出的iPS细胞不能代表真正的iPS细胞。他们将抗药基因插入多能基因Oct4或Nanog位点而非原先的Fbx15位点,取得更好的筛选效果。与之前实验相比,利用Nanog-neo筛选的iPS细胞在嵌合小鼠各组织(包括睾丸)中有很高的分布且这些嵌合体小鼠能够杂交产生纯合后代,因此Nanog-iPS细胞比Fbx15-iPS细胞更加稳定。并且Nanog与抗药基因共表达的iPS细胞能更好地维持多能性和自我更新,以Nanog-neo为筛选标记较Oct4-neo能产生更多的抗药性细胞,可筛选出更高比例的iPS细胞。

2.2 从小鼠到人的突破

2007年年底关于iPS细胞的研究有了从小鼠到人的突破,掀起了又一次iPS细胞研究高潮。日本京都大学Yamanaka研究小组^[8]及美国威斯康辛大学Thomson研究小组^[9]通过独立研究,同时成功地利用人体表皮细胞制造出了类ES细胞。Yamanaka研究人员使用此前的4种转录因子——Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4,导入方式也与此前的小鼠实验类似,供体细胞分别来自一位36岁妇女的表皮和一位69岁男性的结缔组织。利用该技术制造人iPS细胞系的效率约为0.02%,这一效率保证他们在每项实验中都能得到数个细胞系。此次实验还发现四种外源转录因子在人类iPS细胞中发生了很大程度的沉默,因此重编程不需要这些转基因持续表达。Thomson研究小组利用胎儿皮肤细胞以及一个新生儿的包皮细胞独自确定了14种新的候选重组基因,通过系统的排除过程,他们最终也使用了4个基因——Oct4、Sox2、Nanog和Lin28,其中前2个和Yamanaka小组相同,不同的是他们用慢病毒引入四种基因。且其产生iPS细胞的效率仅为Yamanaka小组的一半。这次人体皮肤细胞“直接改造技术”跨越伦理障碍,令在实

实验室中培育出人造人体器官的梦想更近了一步。

2.3 转录因子的优化

四种转录因子诱导体细胞转变为多能干细胞的机制还不是很清楚,并且先前的iPS细胞诱导技术因携带有致癌基因c-Myc而备受关注。人们仍在进一步探寻其他更高效的转录因子组合,通过删减已知转录因子或添加其他因子来代替某个因子,从而简化或优化iPS细胞的生成,为iPS细胞最终安全有效地应用于临床及再生医学奠定基础。实验表明导入c-Myc基因可使嵌合体小鼠的肿瘤发生率高达20%^[7]。因此Yamanaka研究组^[10]按照最初的筛选方法,在无c-Myc的情况下诱导生成多能干细胞。以Nanog-GFP为报告基因,3个基因转导7天后几乎不能获得克隆。在转导14天后用嘌呤霉素筛选细胞,虽然克隆数目少一些,但能够获得ES细胞样克隆,并且在100天以内未发现肿瘤形成。可见小鼠和人类皮肤成纤维细胞转染c-Myc以外的其余3个基因,在调整培养条件后也可得iPS细胞。去除c-Myc基因尽管可显著降低肿瘤形成率,使未来临床应用的安全性显著提高,而且可形成高质量,高特异性iPS细胞,但却使形成iPS细胞的效率明显降低。而用比c-Myc成瘤性更低的n-Myc作为候选基因,尽管部分容易发生分化,也能获得iPS细胞。麻省理工的Ruth Foreman小组^[11]用Wnt取代c-Myc可以诱导生成iPS细胞并且消除致癌障碍,但是Wnt却会降低iPS细胞的转化效率,因此研究者通过改进,将Wnt3a取代c-Myc,确保成功诱导iPS细胞且不降低诱导效率,实验证明还具有提高转化效率的功效。

除了外源表达c-Myc会引发高致癌率外,转录因子数越多则逆转录病毒插入受体细胞基因组引起突变的可能越大。因此用最少数量的转录因子生成iPS细胞更有利于临床应用。Feng等^[12]人利用孤核受体Esrrb将Oct4和Sox2连起来,只用这两种诱导因子就可以诱导出iPS细胞,并且具有类似ES细胞的特异基因表达及表观遗传等特征。Esrrb与很多自我更新及多能性相关基因有关,因此可能通过上调ES细胞特异性基因介导重编程。来自哈佛大学干细胞研究所的科研人员^[13]使用一种化学因子丙戊酸(valproic acid, VPA)取代c-Myc与Klf4转录因子,VPA是一种去乙酰化酶抑制剂,可将人类成纤维细胞基因重排进而转化成两因素诱导的iPS细胞。德国一个研究小组^[14]只用一种外源转录因子Oct4就足以诱导成年小鼠神经干细胞(NSC)为多能干细胞,而NSC表

达内源Sox2, c-Myc和Klf4。他们得到的一个转录因子诱导的多能干细胞与胚胎干细胞相似,且可以再分化为神经干细胞、心肌细胞及种质细胞,证明了,内源表达适量补充转录因子的体细胞可以用更少数量的转录因子诱导而成为多能干细胞。但是仍需进一步研究证明是否只用Oct4就能在其他小鼠和人细胞中生成iPS细胞。

在研究减少非必需转录因子从而简化iPS细胞诱导方法的同时,一些科学家也在进行通过添加少数因子而达到提高诱导效率及稳定性的尝试。我国北京大学邓宏魁教授研究组^[15]通过用多种因子联合4个必须的转化基因(Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc)诱导iPS细胞,再经过一个筛选平台对多种因子进行筛选,结果发现有2种因子可显著提高iPS细胞的转化效率。这两种因子就是p53 siRNA和UTF1,将其与四个诱导基因一起转染到人成纤维细胞中,结果转化iPS细胞的效率可提高100倍,且在剔除c-Myc时同样可以成功诱导iPS细胞并防止细胞发生癌变。中国科学院上海生化细胞所肖磊等^[16]报道了运用6种基因Oct4、Nanog、Sox2、Lin28、c-Myc和Klf4同时诱导人类已分化包皮细胞,可以明显提高获得iPS细胞的效率,证明多基因诱导可以提高基因的重新整合效率。Park等^[17]的研究发现Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4四种转录因子对于诱导人胚胎成纤维细胞和人干细胞分化而来的成纤维细胞是足够的,但诱导新生儿包皮成纤维细胞、骨髓间充质干细胞及成人皮肤成纤维细胞时需加入端粒酶催化亚单位hTERT和具有很强抗凋亡活性的SV40 LargeT才可成功,推测可能是成人体细胞需要附加因子帮助才能更有效地重编程。

2.4 非遗传修饰的iPS细胞生产方法及其进展

诱导性多能干细胞技术的潜力是巨大的,但人们对其探索研究仍处于早期阶段,为了实现iPS细胞最大程度的运用,因此改进iPS细胞的产生方法并确保生成安全有效的iPS细胞克隆和亚克隆是当前需要解决的首要问题。最大的挑战在于利用现有的多种技术产生简单而可靠的方法。病毒载体和外源基因本身都可能导致癌症,另一可能障碍是持续表达的外源转基因会抑制iPS细胞的分化,也会导致iPS细胞在移植入病人体内时有较高的致畸胎瘤的倾向。由于这4种基因只是负责打开重编程的开关,并不需要持续表达,如果改用4种基因对应的蛋白、mRNA或者质粒瞬时转染,或许可以找到更安全的诱导方案。

除了筛选标记的改进和转录因子的优化等策略, 很多研究小组在探寻诱导性多能干细胞产生过程中避免病毒转导及整合进基因组的新方法。非整合的腺病毒转导^[18]和质粒瞬时转染技术^[19]已被采用并成功产生 iPS 细胞, 以防止致癌性外源基因整合进细胞基因组, 同时也表明重编程过程中的插入突变并非是必需的, 但这两种方法只在小鼠上获得 iPS 细胞, 并且与传统方法相比重编程效率非常低, 大约要低 100 倍, 需要进一步改进。Kaji 等^[20]通过一个非病毒整合型载体将 4 个重组基因利用含有 2A 缩氨酸遗传代码的 DNA 串联起来获得称为多顺反子性的质粒, 并有能力表达所有 4 种重组基因。当细胞的蛋白生产“机器”识别了串联基因的 DNA, 它便开始生产蛋白。不过, 它在试图识别存在于两个基因之间的 2A 缩氨酸 DNA 时, 出现了暂时的停顿, 以便让第一个基因的蛋白能被释放出来。然后才转至第二个基因, 并生产该基因对应的蛋白, 在接触 2A 缩氨酸 DNA 的另一片段时再次出现停顿, 以便释放对应第二个基因的蛋白。此过程继续进行, 直到 4 种基因生产完它们各自对应的蛋白为止。这种用单一非病毒载体获得 iPS 细胞的新技术的重编程效率可达 2.5%(远高于传统方法的 0.01%~0.1%), 在消除潜在的有害病毒方面取得了重要进展, 并且可以通过 Cre 酶系统将外源重编程因子完全移除而避免不必要的遗传修饰。

此外, 最近 piggyBac (PB) 转座子系统也被用于没有病毒整合的细胞重编程中^[20,21]。该系统具有高转座活性、准确剪切和广泛的基因组覆盖等优点, 还可以通过 Cre 或 PB 转座酶切除基因组中整合的外源基因, 既减少了肿瘤产生的风险, 同时对于全面筛选基因组中新的重编程因子非常有用。

通过使用一些化学物质或小分子也可以诱导产生 iPS 细胞而避免病毒整合。最近研究表明一些化学物质可以影响染色体修饰或信号转导通路, 通过提高重编程效率或取代特定重编程转录因子而发挥作用。此外哈佛大学干细胞研究所 Hochedlinger 博士认为目前诱导产生 iPS 细胞效率不高的原因之一在于人们对其中复杂的机制仍不了解, 导致无法改善重编程技术。因此 Hochedlinger 小组^[22]开发了一种新的多能干细胞诱导技术, 只需要用药物-病毒系统就能产生 iPS 细胞, 用 doxycycline 来控制转录因子的表达, 制备的 iPS 细胞从结构和功能上都与 ES 细胞很相似。研究者发现, 只要清除掉 doxycycline, 原代的 iPS 细胞就会分化为成熟细胞, 当再次接触 doxycy-

cline 时又会促进第二次重编程, 产生第二代 iPS 细胞。他们的结果显示两次重编程产生 iPS 细胞的效率比一次重编程产生 iPS 细胞的效率要高。

Meissner^[23]、Blaloch^[24]和中科院裴端卿小组^[25], 分别利用了未经遗传修饰以及不需用药物筛选的成体细胞, 探索出了直接运用 iPS 细胞技术的新途径, 仅仅依靠形态标准鉴定就可筛选出想要的 iPS 细胞。在 Meissner 的研究中仅依靠形态标准鉴定 iPS 细胞效率高达 0.4%~0.5%, 比最初的 iPS 细胞研究所用的药物筛选方法大约高 5~10 倍, 对其分化潜能进一步研究可知依靠形态标准筛选而非药物筛选可从野生型供体细胞得到与 ES 细胞特性相似的 iPS 细胞。裴端卿小组的未经修饰且不带有选择标记的小鼠成体细胞获得了近 0.3% 的诱导率。此外, 在 Blaloch 的研究中还发现血清中的细胞因子可能影响重编程过程。无血清培养时, 筛选出的 iPS 细胞量虽少, 但 Oct4-GFP 表达大多为阳性, 而同阶段有血清培养时, 却未能发现 GFP 阳性细胞。所以无血清培养时不仅不能实现重编程, 还可能加速重编程的过程。

2.5 证实 iPS 细胞全能性

尽管目前的 iPS 细胞在很多方面都与 ES 细胞相似, 但是却都没有通过最严格的多能性测验。因此很多人对 iPS 细胞是否具有足够的潜能产生所有机体组织产生质疑。直至 2009 年 7 月我国科学家首次用 iPS 细胞培养出了哺乳动物, 证实了 iPS 细胞的全能性。虽然不是同一课题组却在研究性文章中得出相似的成果。动物的四倍体囊胚只能发育成胎盘, 无法发育成动物个体。高绍荣和他的同事^[26]使用了现有方法重编程了小鼠细胞, 从而分离出了 5 个 iPS 细胞系, 将培育的 iPS 细胞注入小鼠四倍体囊胚腔中, 经胚胎移植后其中一个 iPS 细胞系来源的胚胎发育到期, 出生的胎儿发育至成年。这些完全由 iPS 细胞孕育而成的活体小鼠有力地证明了 iPS 细胞具有真正的全能性。周琪、曾一凡研究小组^[27]构建了 37 株 iPS 细胞系, 然后把其中 6 株的 iPS 细胞分别注入 1500 多枚四倍体囊胚, 进而植入一群代孕白鼠的子宫, 产生了 27 只源于 iPS 细胞的黑色小鼠。多种分子生物学技术鉴定, 这 27 只小鼠确实由 iPS 细胞发育而来, 他们先后与普通白鼠成功配种, 陆续生下数百只第二和第三代小鼠。从目前的实验结果来看没有在小鼠身上发现肿瘤, 但是, 这些小鼠死亡率都颇高, 有的呈现出异常的生理特征, 相关原因还有待进一步实验研究。美国加利福尼亚大学的 Boland 研究小组^[28]也

证明了iPS细胞系能用四倍体互补胚胎产生成体小鼠,并且推测发育过程中重编程基因的不适当表达可能阻碍胚胎及着床后的发育。他们设计了一个药物诱导的慢病毒携带诱导因子重编程策略,以获得外源基因在iPS细胞及其派生物中的严格调控,最终获得了iPS细胞来源的有生育能力的成体小鼠,证明了iPS细胞与ES细胞具有相同的发育潜能。通过比较这些已经证明具有全能性的iPS细胞与不能产生成体后代的却符合其他多能性特征(如嵌合体的生成和种系传递能力)的iPS细胞的异同,也许可以揭示与多能性状态相关的分子差异。

3 iPS细胞的研究范围与应用

随着iPS细胞研究热潮的不断高涨,iPS细胞技术在不同物种、不同组织细胞中都有了成功的报道。继小鼠与人类后,我国的邓宏魁研究组^[29]和肖磊研究组^[30]分别建立了世界首例成年恒河猴和大鼠诱导多能干细胞,裴端卿研究组^[31]、肖磊研究组^[32]和Robert^[33]等分别获得了小型猪和猪的iPS细胞系,表明iPS细胞适用于更多其他哺乳动物,也证明了那些历史上难以建立胚胎干细胞系的物种也能通过“诱导多能干细胞技术”建立干细胞系。继皮肤成纤维细胞后Yamanaka和其他研究小组^[34]已把多种组织(包括肝、胃和大脑)的细胞,转变成了iPS细胞,并让iPS细胞分化成了皮肤、肌肉、胃肠道、软骨、神经细胞以及可以同步搏动的心肌细胞。西班牙科学家采用新方法用头发代替皮肤成功培育出诱导式多能干细胞,大大提高了这种细胞的培育效率,且多能干细胞的增殖能力和发育多样性与胚胎细胞不相上下。采用Yamanaka最初的方法,Aasen等^[35]用成年人角质细胞及头发产生了比Yamanaka效率高100倍,速度快两倍的iPS细胞。日本产业技术综合研究所2008年8月21日在东京举行的研讨会上宣布从拔下的智齿所含细胞中成功培养出了新型万能细胞——iPS细胞。此外我国科学家^[36]将小鼠脑膜细胞诱导为多能干细胞,他们发现Sox2的表达含量在这种细胞中非常高,使得这种细胞易于诱导为iPS细胞。由DNA甲基化分析得知,由脑膜细胞形成的iPS细胞克隆不需要经过筛选就能够发生完全的重编程,而且这些克隆能够100%产生嵌合小鼠。

人类iPS细胞将来可以用于制备疾病的新模型以研究发病机制,还可以用于药物研发中以鉴定药物治疗反应。iPS细胞将会首先用于疾病的模型,然后

才是治疗。Hanna等^[37]已经进行了iPS细胞应用基础研究的首次尝试。利用人类镰状细胞性贫血的小鼠动物模型的尾尖成纤维细胞(TTF)通过导入Oct4、Sox2、Klf4及c-Myc基因,将其重编程为iPS细胞,进一步采用基因特异性打靶技术对人类镰状血红蛋白等位基因(HBS)进行纠正后,然后将纠正后的自体iPS细胞诱导为造血干细胞,移植后可治疗动物模型的镰状细胞性贫血。Wernig等^[38]将iPS细胞诱导分化为神经祖细胞和多巴胺能神经元,后者植入帕金森模型小鼠的纹状体后能改善症状。Thomson研究小组^[39]将重症神经疾病(Spinal muscular atrophy, SMA, 脊髓肌肉萎缩症)患者的皮肤细胞诱导为iPS细胞,培育为神经细胞后,在试管内成功再现了神经细胞因疾病死亡的过程。用iPS细胞可无限度繁殖病变细胞用于研究,使用患者iPS细胞重现病症对于发病机理的研究意义非凡。

此外,哈佛大学George Daley实验室利用诱导细胞重新编程技术把来自10种不同遗传病患者病人的皮肤细胞转变为iPS细胞。还有实验室已从病人身上提取不同细胞,开始建立私人干细胞库。加利福尼亚大学和哈佛干细胞学院正在筹备“iPS细胞银行”的计划,干细胞治疗已经离人类越来越近了。

4 iPS细胞的前景展望与尚存问题

将成体干细胞再程序化为胚胎干细胞,可以为组织工程和移植治疗提供取之不尽的免疫兼容细胞,同时使科学家能找到无须毁灭胚胎而得到胚胎干细胞的途径,不再因伦理道德问题而束缚探索真理的脚步。获取多能干细胞的其它手段都有其各自的局限性,对于大多哺乳动物来说,体细胞核移植最大的问题是克隆胚胎发育异常多,发育为正常个体或提取多能干细胞的效率低。据统计约有64%的克隆牛、40%的克隆羊和93%的克隆小鼠存在各种各样的生理异常,这些异常包括胎盘肥大、巨大胎儿、肺部高压、循环障碍、肝纤维化等^[40]。而通过与ES细胞等融合而重编程产生多潜能细胞也有一个主要的障碍,就是当体细胞基因组被重新编程时,重编程细胞的四倍体状态使得其表观分析很困难。杂交细胞中ES细胞基因组的残留也不利于细胞治疗。因此通过强制的多潜能因子的过表达进行细胞重编程,即iPS细胞的产生为干细胞基础研究领域及其应用于病理、毒理、再生医学及新药开发的研究提供了广阔的前景。

但需指出的是, iPS 细胞研究的突破并不意味着 ES 细胞研究的衰亡, 因为配子和胚胎的发育经历的独特变化是无法人工模拟的。从理论上说, iPS 细胞的功能类似于通过胚胎克隆技术取得的 ES 细胞, 能够最终培育成人体组织或器官。但 iPS 细胞的诱导分化是否和 ES 细胞的诱导条件相同还不得而知, 而这些试验产物的均一性以及他们是否有潜在危害还有待进一步研究。目前仍然需要彻底分析和了解这些诱导的多功能细胞的能力到底有多大, 并最终知道它们如何能够用做疾病模型和治疗工具。此外, 因为目前研究所用的转录因子转导效率和克隆筛选分离方法多种多样, 目前还没有统一的标准评价不同方法产生 iPS 细胞的效率。已有的研究大多根据碱性磷酸酶的活性、报告基因的激活及嵌合体的产生、种系传播等特征作为判断重编程及其重编程效率的依据, 然而这些特征的定量化操作复杂, 也许不能作为今后人类 iPS 细胞临床应用的标准。因此应尽快出台一个统一的诱导性多潜能干细胞的评价标准。

总之, iPS 细胞的研究为基础研究及实践应用开辟了一条新的途径。iPS 细胞正向着同一个目标前进——病人特异的干细胞。对于人 iPS 细胞是否能替代 ES 细胞在医疗上的应用还需进一步的探索研究。下一步的研究工作应将更深入研究体细胞回调成 ES 细胞的基因或改变进程的机制, 并找出一种方法, 通过开放一些基因来使细胞重新编程而不是靠有可能造成转基因及基因沉默的插入新的基因副本来完成。

参考文献(References)

- 1 Piedrahita JA, Mir B, Dindot S, Walker S. Somatic cell cloning: the ultimate form of nuclear reprogramming. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(5): 1140-4.
- 2 Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001; 11(19): 1553-8.
- 3 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.
- 4 Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119 (7): 1001-12.
- 5 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456: 344-9.
- 6 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.
- 7 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-7.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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: 101-6.
- 11 Marson A, Foreman R, Chevalier B, Bilodeau S, Kahn M, Young RA, *et al.* Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008; 3(2): 132-5.
- 12 Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng J, Heng JD, Chan Y, *et al.* Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009; 11(2): 197-203.
- 13 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.
- 14 Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; 136(3): 411-9.
- 15 Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, *et al.* Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 2008; 3(5): 475-9.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322 (5903): 945-9.
- 19 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.
- 20 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: 771-5.
- 21 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai P, Mileikovsky M, Hämmäläinen R, *et al.* PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458: 766-70.
- 22 Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. High-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 340-5.
- 23 Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25(10): 1177-81.

- 24 Blleloch R, Venere M, Yen J, Ramalho M, Ramalho-Santos M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 245-7.
- 25 Qin D, Li W, Zhang J, Pei D. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. *Cell Res* 2007; 17(11): 959-62.
- 26 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.
- 27 Zhao X, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009; 461: 86-90.
- 28 Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, *et al.* Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 461: 91-4.
- 29 Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 587-90.
- 30 Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 11-5.
- 31 Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem* 2009; 284(26): 17634-40.
- 32 Wu Z, Chen J, Ren J, Bao L, Liao J, Cui C, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell* 2009; 1(1): 46-54.
- 33 Roberts RM, Telugu BP, Ezashi T. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): why they may prove to be important. *Cell Cycle* 2009; 8(19): 3078-81.
- 34 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.
- 35 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1276-84.
- 36 Qin D, Gan Y, Shao K, Wang H, Li W, Wang T, *et al.* Mouse meningiocytes express Sox2 and yield high efficiency of chimeras after nuclear reprogramming with exogenous factors. *J Biol Chem* 2008; 283(48): 33730-5.
- 37 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun C, 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.
- 38 Wernig M, Zhao J, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(15): 5856-61.
- 39 Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr, Mattis VB, Lorson CL, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457: 277-80.
- 40 Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza RP. The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol* 2002; 20(1): 13-4.

Research Progress of Induced Pluripotent Stem Cells

Ri-Na Sa¹, Xi-He Li^{1,2}, Rong-Feng Li^{1*}

(¹Key Laboratory of Ministry of Education of China for Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; ²Inner Mongolia Mengniu Reproductive Biotechnology CO.,LTD., Shengle Economic District, Helin Geer, Huhhot 011517, China)

Abstract The recent success on induced pluripotent stem cells (iPSC, iPS Cells) is a significant landmark for Stem Cells research, which has been a hot topic in life science field. Japanese and American scientists successfully established mouse and human iPS cell lines in 2006 and 2007 respectively and only three years later, iPS cells research has been developed at tremendous rapid and numerous relative improvements and breakthroughs have been achieved in both of basic and application fields. iPS cells ranked number 1 of top 10 science stories in *Nature Science times* (2007) and *Science* (2008). This review summarizes the background of iPS cells research, the different strategies used to generate iPS cells and their developments, application status on mammals and the prospects and problems of current iPS cells techniques. This review might be helpful for related scientists to further investigate iPS cells.

Key words induced pluripotent stem cells; mammal; research progress

Received: December 7, 2009 Accepted: August 26, 2010

This work was supported by the National High-tech Research and Development Program of China(863 Program)(No.2009AA10Z111) and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region(No.2009ZD02)

*Corresponding author. Tel: 86-471-4992443, Fax: 86-471-4995071, E-mail: lirf01@yahoo.com.cn