

体细胞重编程为多能干干细胞的研究进展

常 灏 郭 彤 彦 萌 孙 可 朱宝长*

(首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要 胚胎干细胞不仅是研究哺乳动物早期胚胎发育、细胞分化、基因表达调控等发育生物学问题的有力工具, 还可用于新药评价、细胞治疗等方面的研究。然而, 为科学研究而捐献的人类卵子并不能够轻易获得, 限制了人类胚胎干细胞相关研究的进展, 解决这个问题的理想办法就是找到能够替代胚胎干细胞的其他成体多能细胞。综述了将哺乳动物体细胞诱导为多能干干细胞的方法, 重点介绍了利用特定的转录因子将体细胞诱导为诱导多能干干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)的最新进展, 详细阐述了转录因子在诱导细胞重编程过程中发挥的作用, 以及 iPS 细胞筛选与鉴定的方法, 并展望了 iPS 细胞的应用前景。

关键词 重编程; 诱导多能干干细胞; 转录因子; 多能性; 成纤维细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)来源于囊胚的内细胞团(inner cell mass, ICM), 具有分化为各种细胞类型的多能性和体外不断扩增的能力。虽然 ES 细胞有望作为细胞治疗中供体细胞的来源, 但仍面临细胞移植后发生免疫排斥的危险, 并且使用人的胚胎将涉及伦理问题。如果可以从患者的体细胞直接获得像 ES 细胞一样具有多能性的细胞, 那么上述问题都将得以解决。目前, 获得具有类似 ES 细胞多向分化潜能特性的多能干干细胞的方法有: 体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)、细胞融合、体外培养, 以及转录因子诱导等。近两年来, 利用特定的转录因子将体细胞诱导为诱导多能干干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞)的研究获得了突破性进展。本文将对体细胞重编程为多能干干细胞的方法做简要介绍, 详细阐述利用转录因子诱导体细胞为多能干细胞的最新进展, 以及转录因子在诱导体细胞重编程过程中发挥的作用。

1 体细胞重编程的方法

重编程主要表现为分化潜能的增强, 即终末分化的细胞重新获得分化能力的过程。自然情况下, 重编程发生于具有再生能力的器官中, 也可以通过体细胞核移植、细胞融合、以及体外培养等技术诱导发生。目前, 最受关注的细胞重编程方法是将一些特定转录因子的基因通过转染, 使其整合到受体细胞的核基因组, 以重新激活多能性相关基因的表达, 诱导细胞发生重编程, 从而将这些细胞改造为具有多向分化潜能的干细胞。

1.1 体细胞核移植

1952 年, Briggs 等^[1]首次成功地将豹蛙囊胚的细胞核移植到已去除细胞核的卵细胞中, 孵化出了正常的蝌蚪。此后的 50 年, 细胞核的全能性不断被更多的核移植实验所证实。由于哺乳动物的卵细胞比两栖类小许多, 核移植的技术难度较高, 直到 1975 年才有将此技术应用于哺乳动物的报道, Bromhall^[2]将兔的囊胚细胞核移植到去核的卵细胞中, 得到了发育至桑椹胚的胚胎。1997 年克隆羊“Dolly”的诞生^[3], 更是促进了此项技术的发展。目前, 体细胞核移植已先后在绵羊、牛、小鼠、猪、山羊、猫、兔等动物上取得了成功^[4]。2008 年 1 月, French 等^[5]成功地利用此技术用 21 个人的卵母细胞克隆了 5 个人体胚胎。虽然通过核移植技术可以得到克隆的后代, 但在克隆的动物中发育不正常的现象很多见。而且, 人的卵细胞并不易获得、克隆率低又涉及伦理问题, 因而限制了此技术的应用。

1.2 细胞融合

1976 年, Miller 等^[6]证明了胸腺细胞与畸胎瘤细胞(embryonic carcinoma cell, EC 细胞)融合后显示出了多能性。将小鼠或人类的体细胞与 ES 细胞融合后, 均可使细胞发生重编程并表达多能性特异的基因^[7,8]。细胞融合的实验, 解决了到底是 ES 细胞的细胞核还是细胞质为重编程所必须的问题。将 ES 细胞的细胞核与细胞质分别与神经胶质细胞融合后发现, 与细胞核发生融合的杂交细胞检测到了 Oct3/4 的

收稿日期: 2008-03-17 接受日期: 2008-06-26

通讯作者: Tel: 010-68903623, E-mail: baochang@mail.cnu.edu.cn

表达,而与细胞质发生融合的杂交细胞未检测到^[9]。这说明ES细胞的细胞核在细胞发生重编程的过程中是必须的。然而,两种细胞的融合将不可避免地使杂交细胞多出一套染色体,这就限制了此法在临床上的应用。

1.3 体外培养

使用无细胞系统能够更进一步研究发生重编程的可能机制。将人类的体细胞用爪蟾卵母细胞,或胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EG细胞),或EC细胞,或ES细胞的提取物处理后,细胞分化能力的逆转获得了部分成功。这些细胞大多能够重新表达Oct3/4等多能性细胞特异的标志^[10]。然而,这些成功的范例似乎仅存在于HEK293T细胞中,而且这些研究也不能排除多能性特异标志的表达来自于原先的多能干细胞的可能性。

从生理学角度来讲,ES细胞实际上并不存在,而是囊胚的ICM在体外长期培养的过程中发生了重编程和变化的结果。同样,原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)经过长期的体外培养也可形成多能的EG细胞。因此,通过在适宜的条件下培养其他类型的细胞也有可能获得多能干细胞。Jiang等^[11]发现骨髓来源的细胞经过长时间培养可以转变为多能干细胞,他们把这类细胞称作多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)。MAPCs与ES细胞不同,它的生长需要较低的血清浓度,并可在低密度下维持其特性。MAPCs也可参与形成嵌合体^[11],然而这些特性的普遍性和稳定性还需要更多的实验支持。Kanatsu-Shinohara等^[12]长期培养了来自新生小鼠睾丸的生殖干细胞(germline stem cell, GS细胞),在含有胶质细胞源性神经生长因子(glial cell derived neurotrophic factor, GDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和白白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)的培养条件下,除了产生GS细胞克隆外,还出现了一种类似ES细胞的克隆。这些细胞被称作多能生殖干细胞(multipotent germline stem, mGS细胞)细胞,此类细胞具有与ES细胞相似的形态和增殖效率,并且可以形成畸胎瘤、产生生殖系嵌合的嵌合体小鼠,证明其具有多能性。此外,从成年小鼠睾丸中分离出的精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)在基础培养基中培养2周后,再转移至含有LIF或以小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)为饲养层的培养条件下也可以

产生多能细胞。这种细胞可以在ES细胞的培养条件下扩增,并且具有与ES细胞类似的特性和分化潜能^[13]。然而,此法并不适用于雌性生殖细胞。因为雌性生殖细胞本身不是干细胞,而且即使ES细胞可以从孤雌生殖而来的胚胎获得,这类ES细胞大多也会因MHC I的缺失而被天然杀伤细胞(natural killer cell, NK细胞)识别和杀伤。

1.4 转录因子诱导

2006年, Takahashi等^[14]发现将Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4这四个转录因子的基因,通过反转录病毒载体的转染整合到MEFs和小鼠尾尖成纤维细胞(tail-tip fibroblasts, TTFs)的核基因组后,将这些细胞诱导成了像ES细胞一样具有多向分化潜能的干细胞,由这种方法得到的细胞称为iPS细胞。由此,诱导体细胞为iPS细胞成为了细胞重编程领域研究的热点。2007年11月, Takahashi等^[15]和Yu等^[16]分别成功地将人类的成纤维细胞诱导成了iPS细胞,使得利用iPS细胞用于临床治疗的可能性又向前迈进了一步。2008年4月, Hanna等^[17]采用类似于诱导成纤维细胞为iPS细胞的方法,在加入了CCATT/增强子结合蛋白(C/EBP α)的情况下,利用反转录病毒将Oct4、Sox2、c-Myc与Klf4四个基因转移至成熟的小鼠B细胞中后,将其重编程成了iPS细胞。

我国对iPS细胞的研究也获得了突破性进展。2007年11月, Qin等^[18]利用反转录病毒将Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4导入未经遗传修饰的小鼠成纤维细胞,将其诱导成了iPS细胞。2008年4月, Liao等^[19]采用携带OCT3/4、SOX2、c-MYC、KLF4、NANOG和LIN28这六个基因的慢病毒转染新生儿阴茎包皮成纤维细胞,将其诱导成了iPS细胞,这是国内首次诱导成功人类iPS细胞的报道。而且,六个转录因子的诱导效率比四个转录因子的高10倍,iPS细胞克隆也出现得更早。

2 相关的转录因子

诱导体细胞的重编程至少需要3个或4个关键的转录因子发挥作用。Yamanaka研究组一直使用他们筛选出的Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4^[14,15,20,21],而Yu等^[16]则选择了OCT3/4、SOX2、NANOG、LIN28。随着研究的不断深入, Nakagawa等^[22]和Wernig等^[23]均报道了在不转染c-Myc,只使用Oct3/4、Sox2、Klf4这3个基因进行整合的情况下,也可成功诱导出iPS细胞,只不过诱导所需要的时间更长,效率更低。

在转录因子的选择上, 还有使用 Oct3/4、Sox2、n-Myc、Klf4 组合的报道^[24]。这些组合的诱导时间和效率都略有不同, 其作用机制仍不十分清楚。虽然目前尚没有确定的转录因子组合得到公认, 但可以肯定的是 Oct3/4 和 Sox2 在诱导细胞发生重编程的过程中发挥了重要作用。

2.1 Oct3/4

转录因子 Oct3/4 (又称 Pou5f1), 属于 Oct 蛋白家族, 含有 POU 结构域, 参与多种基因的调节, 特异性地表达于 EC 细胞、早期胚胎和生殖细胞中, 是维持细胞自我更新和多能性的关键因子。体外培养的 Oct3/4 缺陷型纯合体胚胎, 其 ICM 只能形成胚胎滋养层细胞, 而不能形成 ES 细胞^[25]。抑制 Oct3/4 的表达, 将导致小鼠和人的 ES 细胞自发地向胚胎滋养层分化^[26]。Oct3/4 不仅能够维持 ES 细胞的多能性, 而且还能促进 ES 细胞的分化。当小鼠 ES 细胞中 Oct3/4 表达量提高 50% 时, 即可导致其自发地向原始内胚层和中胚层分化^[26]。此外, Oct3/4 还在心肌的分化过程中起到了重要的作用。因此, Oct3/4 的表达水平是决定小鼠 ES 细胞命运的重要因素。

2.2 Sox2

转录因子 Sox2 (SRY-related HMG box2) 是 HMG 框 (high-mobility group box) 家族转录因子的一员, 表达于 EC 细胞、ICM、外胚层和生殖细胞中。与 Oct3/4 一样, Sox2 对于胚胎发育和阻止 ES 细胞的分化都是必须的。不同的是, Sox2 在胚外外胚层的多能细胞中也有表达。Sox2 的缺失将使胚胎因外胚层发育缺陷而死于植入的时期^[27]。Sox2 缺陷型纯合体的胚泡 (blastocyst), 虽然在形态上是正常的, 但在体外培养时这些未分化的细胞却不能增殖, 且只能产生滋养外胚层和原始内胚层样的细胞^[28]。通过 RNA 干扰技术使 Sox2 在小鼠 ES 细胞表达下调, 将促进 ES 细胞的分化^[29]。

2.3 c-Myc

转录因子 c-Myc、n-Myc、l-Myc 都属于 HLH 蛋白家族, 含有亮氨酸拉链及螺旋-环-螺旋结构。在人类的基因组中, c-Myc 有大量的结合位点, 它可能通过修饰染色质的结构和调节非编码 RNA 的表达, 参与细胞的生长、分化和增殖等多种功能的调节。

c-Myc 是 LIF/STAT3 和 Wnt 这两个维持细胞多能性途径的主要下游靶基因^[12]。即使在不含 LIF 的培养条件下, 稳定表达 c-Myc 的小鼠 ES 细胞仍能够保持自我更新和形成嵌合体小鼠的能力^[30]。

c-Myc 本身又是一种原癌基因, 因而它的使用会给 iPS 细胞带来致癌性的可能, 这就限制了其在临床上的应用。c-Myc 的主要作用可能是增强细胞增殖的能力, 因此也许可以通过使用非原癌基因或外源的生长因子来代替 c-Myc 的功能^[22]。

2.4 Klf4

转录因子 Klf4 (Krüppel-like factor 4) 是 Krüppel 样家族蛋白的成员之一, 具有锌指结构, 高表达于小鼠的 ES 细胞, 以及有丝分裂后期的皮肤和胃肠的上皮细胞, 在 MEFs 和 NIH3T3 细胞也有表达。

与 c-Myc 一样, 在 ES 细胞中, Klf4 也是 LIF/STAT3 途径的下游基因之一, 其作用机制与 Sox2 相似, 作为协同因子参与 Oct3/4 介导的基因表达调控。

Klf4 虽是一个原癌基因, 却具有抑制肿瘤的功能^[31]。它可以通过直接抑制 p53 的表达, 从而参与调节一系列与 p53 相关联的基因表达调控。在小鼠胚胎的发育过程中, Klf4 可以通过抑制 p53 间接上调 Nanog 的表达, 以维持 ES 细胞的未分化状态^[32]; 还可以通过对 p53 的调节, 阻止由 Myc 诱导的凋亡发生^[12]。Klf4 的过表达将导致 Oct3/4 的持续表达并抑制 ES 细胞的分化^[33]和细胞的增殖, 而只要切断其靶基因之一的 p21, 就可以拯救 Klf4 所带来的抑制现象。缺失 p21 的细胞, Klf4 将通过下调 p53 促进细胞的增殖。p21 也许作为开关决定了 Klf4 信号转导的结果。

2.5 Nanog

2003 年, Chambers 等^[34]和 Mitsui 等^[35]的研究发现, Nanog 在维持 ES 细胞自我更新和多向分化潜能中具有非常重要的作用。与 c-Myc 和 Klf4 不同, 同源异型蛋白 Nanog (来自 Tir Na Nog, 意为长生不老) 是不依赖于 LIF/STAT3 途径而独自维持 ES 细胞多能性的因子。

在小鼠 ES 细胞中, Nanog 与 Klf4 和 Klf5 结合; 而在人类的 ES 细胞中, Klf5 与 Oct3/4、Sox2 和 Nanog 共同结合。Klf4 可以通过抑制 p53 的表达而促进细胞的增殖, 而 p53 又是 Nanog 的一个负向调节因子, 因此, Nanog 的过表达将不再需要 Klf4/p53 途径的激活。而且, 在重编程的起始阶段, Nanog 还可与 Oct3/4 和 Sox2 共同发挥作用, 从而替代 Klf4 的一些功能。因此可以推测, 通过 Oct3/4、Sox2 和 Nanog 而激活 Klf5 足以弥补外源 Klf4 的缺少。总之, 在人类体细胞的重编程过程中, Nanog 可能调节了下游基因 Klf4 和 c-Myc 的表达, 从而取代 Klf4 和 c-Myc 的作用^[36]。

2.6 Lin28

Lin28 是一种 RNA 结合蛋白, 在 ES 细胞的分化过程中其表达逐渐下调, 在人类体细胞的重编程过程中发挥了一定的作用。然而, RT-PCR 显示诱导的 iPS 细胞中有一些克隆并没有发生 *LIN28* 的转录^[16], 说明 Lin28 也许既不是重编程起始所必需的, 也不是维持 iPS 细胞稳定增殖所需要的。

3 iPS 细胞的筛选与鉴定

3.1 抗性筛选

Takahashi 等^[14]首先使用了 *Fbx15* 作为筛选多能性细胞的报告基因, 设计了 *Fbx15*- β -geo 的筛选策略。*Fbx15* 主要表达于小鼠未分化的 ES 细胞中, 然而它并不是保持 ES 细胞自我更新和小鼠发育所必需的。如果启动了 *Fbx15* 的表达, 说明细胞发生重编程后具有了多能性, 即可得到抗新霉素和 β -半乳糖苷酶阳性的 iPS 细胞。此后 iPS 细胞的筛选均采取了类似的策略(图 1)^[37]。本文将采用 *Fbx15* 作为报告基因筛选出的细胞称为 *Fbx15*-selected iPS 细胞(下同)。

然而, *Fbx15*-selected iPS 细胞的重编程似乎并不完全, 与 ES 细胞存在差异, 需要使用比 *Fbx15* 筛选多能性细胞更严格的基因。Okita 等^[20]和 Maherali 等^[38]同时报道了使用更为严格的 *Nanog* 作为报告基因的方法(*Nanog*-GFP-neo)。通过实验结果的对比, 可以发现 *Fbx15*-selected iPS 细胞与 *Nanog*-selected iPS 细胞确实存在一些差异。*Fbx15*-selected iPS 细胞可以形成胚胎的多种组织, 然而这些胚胎将死于怀孕中期, 说明其发育潜能有一定的限制性^[38]。而且,

Fbx15-selected iPS 细胞在反转录病毒转染后 3 天就有类似 ES 细胞的克隆出现, 而 *Nanog*-selected iPS 细胞要在转染 7 天后才能筛选到。说明这两种基因的筛选方法在重编程的动力学上是有区别的。重亚硫酸盐序列分析(bisulfite sequencing analysis)显示 *Fbx15*-selected iPS 细胞与 *Nanog*-selected iPS 细胞也有些许不同, *Fbx15*-selected iPS 细胞在 *Nanog* 和 *Oct3/4* 的启动子区域是部分去甲基化的, 而在 *Nanog* iPS 细胞是完全去甲基化的。RT-PCR 显示, 长期培养的 *Fbx15*-selected iPS 细胞将丢失 ES 细胞特异基因的表达。相反, *Nanog*-selected iPS 细胞依然保持相对高水平的表达 ES 细胞特异性的基因。*Fbx15*-selected iPS 细胞与 *Nanog*-selected iPS 细胞对 LIF 和视黄酸(retinoic acid, RA)的反应也不同。在有 LIF 而没有饲养层的条件下培养, *Fbx15*-selected iPS 细胞不能保持未分化的状态, 而 *Nanog*-selected iPS 细胞却可以保持未分化的状态。而且, 在有 RA 而没有饲养层细胞的培养环境下, *Fbx15*-selected iPS 细胞会形成紧密的克隆, 而 RA 却可以诱导 *Nanog*-selected iPS 细胞的分化^[35]。以上这些实验都说明 *Nanog*-selected iPS 细胞比 *Fbx15*-selected iPS 细胞更稳定。但是, *Nanog*-selected iPS 细胞的诱导效率(0.001%~0.03%)却是 *Fbx15*-selected iPS 细胞(0.01%~0.5%)的十分之一。更多的诱导 iPS 细胞的实验则采用了 *Oct3/4*-GFP-neo 的筛选策略, 并且发现 *Oct3/4*-selected iPS 细胞与 ES 细胞具有很强的相似性。

然而, 同样使用 *Fbx15* 筛选策略, Aoi 等^[21]又成功地将肝细胞和胃上皮细胞用同样的方法诱导成了 iPS 细胞。这些 iPS 细胞注入囊胚后, 能获得活至成年的嵌合体小鼠, 而且这些嵌合体小鼠到 30 周龄时仍没有肿瘤发生的迹象。这一结果不仅进一步排除了 iPS 细胞是由共存于成纤维细胞中未分化的干细胞扩增而来, 从而导致诱导效率低的可能性, 而且表明不同来源的 *Fbx15*-selected iPS 细胞发生重编程的程度也是不一样的。

3.2 形态学筛选

以上各种 iPS 细胞的筛选方法或基于 *Fbx15*、或基于 *Nanog*、或基于 *Oct3/4* 的激活, 都是通过同源重组分别插入了一个抗药基因, 这就限制了 iPS 细胞的来源, 给其临床应用带来了困难。

Blelloch 等^[24]的方法避免了使用抗药基因作为报告基因的问题, 简化了 iPS 细胞的诱导方法, 向临床应用又迈进了一步。他们用 *n-Myc* 代替 *c-Myc*, 用携

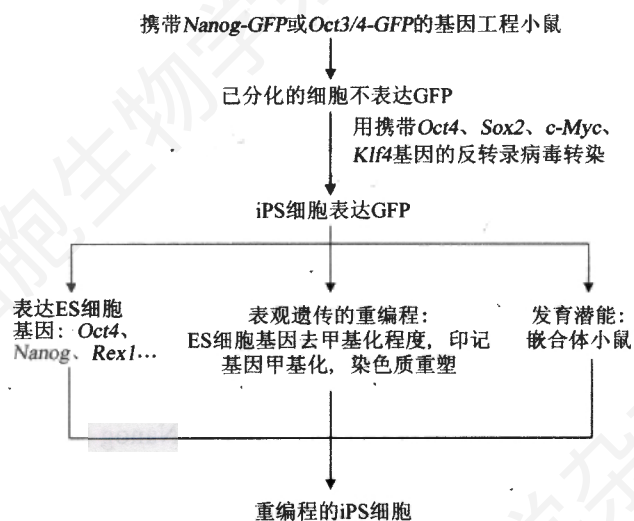


图 1 iPS 细胞的诱导过程(改自 Qi 等^[37])

带 *Oct4*、*Sox2*、*Klf4*、*n-Myc* 基因的慢病毒作为载体, 转染了没有抗性标记的 MEFs, 获得了可以形成畸胎瘤和嵌合体小鼠的 iPS 细胞。他们还发现在无血清的培养条件下更容易使细胞发生重编程。

Meissner 等^[39]也强调细胞无需经过基因修饰, 从形态上就可以鉴定出 iPS 细胞, 而且比药物筛选的效率更高, 发生重编程的总体效率约为 0.5%, 比药物筛选的方法提高了 5~10 倍。他们将药物未筛选出来, 而形态上与 ES 细胞相类似的 iPS 细胞进行了 SCID 小鼠皮下注射以及 2N 和 4N 的囊胚注射实验, 结果显示可以形成畸胎瘤和嵌合体小鼠, 并且可以挽救 4N 的胚胎。说明这些细胞也具有多能性, 仅从形态特征筛选 iPS 细胞是可行的^[38]。

成纤维细胞来源的 Fbx15-selected iPS 细胞不能形成嵌合体小鼠, 这可能与重编程进程缓慢有关系。也许使用在形态学上鉴定的方法, Fbx15-selected iPS 细胞会得到与 Oct3/4 iPS 细胞一样的多能性。

3.3 iPS 细胞的鉴定

鉴定 iPS 细胞多能性的方法与 ES 细胞的类似, 主要有形态学观察、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)染色和多能性特异表面标记的检测等。iPS 细胞具有与 ES 细胞相似的形态特征: 细胞呈集落状生长, 集落内的干细胞核大、核仁清楚, 核质比高。iPS 细胞碱性磷酸酶染色呈阳性, 并且通过 Western 印迹、流式细胞术、免疫组织化学等方法的检测, 发现 iPS 细胞能够表达 ES 细胞的表面标记, 如 SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 等。此外, RT-PCR 结果显示, *Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc*、*Klf4* 等外源基因经过反转录病毒的转染后整合到了 iPS 细胞的核基因组, 并已开始内源性基因的转录。

除了上述常用的检测方法外, 从表观遗传学的层面对 iPS 细胞所处的分化状态进行分析也是极为重要的。目前, 使用较多的技术主要有染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)和重亚硫酸盐序列分析等。目前各实验室所获得的 iPS 细胞在 DNA 的甲基化程度上均与 ES 细胞相似, *Oct3/4*、*Nanog* 等与细胞多能性相关基因的启动子区域在这两类细胞中处于去甲基化状态, 而在 MEFs 和人类的皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDFs)等体细胞中处于甲基化状态。此外, X 染色体的失活也是重要的表观遗传现象之一。Maherali 等^[38]把绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)连接到雌性小鼠 TTFs 的 X 染色体上, 若 X 染色体失活, 则 GFP

不表达。将不表达 GFP 的细胞, 经 Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 这四个因子的诱导后, 产生了表达 GFP 的 iPS 细胞。这些 iPS 细胞中的一部分分化成了表达 GFP 的细胞, 而另一部分则分化成了不表达 GFP 的细胞。说明 iPS 细胞与 ES 细胞一样, 在分化为体细胞的过程中, X 染色体失活的发生是随机的。

细胞是否具有多向分化潜能, 更为直观而严格的鉴定手段是看其能否在体内分化形成畸胎瘤以及构建嵌合体小鼠的能力。将 iPS 细胞注射到 SCID 小鼠的皮下部位, 4 周后(或更长), 有瘤块生长, 经固定、包埋、切片、HE 染色, 可见三个胚层来源的组织。其中, 最具代表性的是外胚层的神经组织、中胚层的肌腱组织和内胚层的肠内皮细胞。将 iPS 细胞注入小鼠 3.5 dpc 的囊胚, 然后移植到代孕母鼠的子宫内, 可以得到嵌合体小鼠, 甚至生殖系嵌合的小鼠。将 iPS 细胞注入 4N 的胚泡中, 能够进入生殖系并且产生中晚期的胚胎。虽然这种最严格的检验细胞全能性的方法不能得到活至成体的嵌合体小鼠, 但已经能够说明 iPS 细胞具备了类似 ES 细胞多能性的特点。

综上所述, iPS 细胞在形态、DNA 甲基化程度、基因表达情况和染色质状态等各方面均与 ES 细胞极为相似, 并可以形成生殖系嵌合的嵌合体小鼠, 说明 iPS 细胞已经具备了多向分化潜能的特性。

4 转录因子的诱导作用

4.1 转录因子间的相互作用

Oct3/4 决定了细胞向 ES 样细胞的方向发展, 而不是形成肿瘤细胞。然而, 仅有 Oct3/4 的作用不足以使细胞获得全能性。Oct3/4 和 Sox2 的共同作用是激活下游基因所需要的, 尽管 Sox2 也许并不是起始重编程发生所必需的。

Myc 与 Klf4 在胚胎植入前对小鼠的发育都是必要的。Takahashi 等^[15]推测 c-Myc 和 Klf4 修饰了染色质的结构, 从而便于 Oct3/4 和 Sox2 与各自的靶点结合。Klf4 还可以通过 p21 的激活抑制细胞的增殖, 而 c-Myc 却可以抑制 p21 从而起到相反的作用。因此, Klf4 与 c-Myc 的平衡对于 iPS 细胞的生长和自我更新是十分重要的。Myc 或 Klf4 单独的过表达, 将产生肿瘤细胞, 而不是形成多能干细胞。

基因启动子区域的 Sox2 调控元件与 Oct3/4 和 Nanog 结合位点通常很接近。一些 ES 细胞特异性基因的转录是由 Sox2 与 Oct3/4 共同完成的。Sox2 与 Oct3/4 组成异二聚体协同调控 *Fgf4*、*UTF1* 和 *Fbx15*

等基因的表达。而且,它们还能形成类似的二聚体调控自身以及 *Nanog* [31,40] 的表达。*Fgf4* 和 *UTF1* 等其他 Oct-Sox 靶基因的表达可能是 Sox 家族其他蛋白质维持的 [28]。ChIP 的分析结果也证实 Oct3/4、Sox2、*Nanog* 在小鼠和人类的 ES 细胞中有很多共同的靶基因 [41,42]。然而, Sox2 缺失的小鼠 ES 细胞却可以被 Sox2 和 Oct3/4 的 cDNA 所拯救,说明 Sox2 的基本功能可能是维持 Oct3/4 的表达 [43]。

4.2 转染 *c-Myc* 的必要性

Blelloch 等 [24] 对囊胚中的 ICM、ES 细胞,以及 EG 细胞等多能细胞的基因表达谱进行了分析,发现 *n-Myc* 基因在这些多能干细胞中的表达都是上调的。在没有药物筛选的情况下,用 Oct3/4、Sox2、*n-Myc*、*Klf4* 也可以将小鼠胚胎成纤维细胞诱导为 iPS 细胞。这种 iPS 细胞也可以形成嵌合体小鼠,并且比使用 *c-Myc* 具有更小的致瘤性。

随着研究的深入, Nakagawa 等 [22] 和 Wernig 等 [23] 都报道了不使用 *c-Myc*, 仅转染 Oct3/4、Sox2 和 *Klf4* 三个因子即可诱导产生 iPS 细胞。这些用 3 个因子诱导的 *Nanog*-selected iPS 细胞和 Oct3/4-selected iPS 细胞均表达了 ES 细胞特异性的 *Nanog*、SSEA-1 等表面标记,并且 AP 染色成阳性,可以形成畸胎瘤。但是,在不转入 *c-Myc* 的情况下,细胞的重编程将推迟,并且重编程的效率会低一到两个数量级。Wernig 等 [23] 在转染后 6 天,加入新霉素进行筛选,只有转染了 4 个因子的细胞产生了抗性克隆,而转染了 3 个因子的细胞没有抗性克隆产生,直到转染后约 21 天才出现抗性克隆。

Takahashi 等 [4] 最初的实验在不使用 *c-Myc* 诱导的情况下并没有得到 iPS 细胞克隆,而随后的研究却显示没有 *c-Myc* 的诱导也可以形成 iPS 细胞克隆,只不过数量更少。二者的主要区别在于:前者是转染 7 天后开始筛选,而后者是 14 天。这说明在缺乏 *c-Myc* 因子的情况下,细胞重编程发生得更慢 [22],但排除了致瘤性的可能。Nakagawa 等 [22] 用未经 *c-Myc* 转染而得到的 iPS 细胞,制作了 26 只嵌合体小鼠,它们在出生后 100 天均没有死亡;而用经 4 个因子转染诱导得到的 iPS 细胞制作的 37 只嵌合体中有 6 只死于肿瘤。然而,是否在更长的时间会形成肿瘤还有待研究。

Aoi 等 [21] 在诱导肝脏和胃上皮细胞来源 iPS 细胞的研究中,通过 RT-PCR 检测 ES 细胞特异性基因的转录情况以及 Oct3/4 和 *Nanog* 启动子区域甲基化程度的检测,发现这些 iPS 细胞更像先前没有使用 *c-*

Myc 而获得的 iPS 细胞,而且比 TTFs 来源的 iPS 细胞更具有 ES 细胞的特性。说明 *c-Myc* 在诱导肝细胞和胃上皮细胞为 iPS 细胞的过程中比诱导成纤维细胞为 iPS 细胞的作用更小。

在不使用 *c-Myc* 诱导的情况下,虽然可以使 MEFs 等体细胞重编程为 iPS 细胞,但并不能确定 *c-Myc* 不是必须的,因为仍有内源性表达 *c-Myc* 的可能性存在, Oct3/4、Sox2、*Klf4* 也许可以召集内源性的 *c-Myc* 诱导重编程的发生 [22]。因此, *c-Myc* 是否为诱导所必须的因子,它的功能是否可以完全由 *n-Myc* 所代替,尚需更多且更严格的实验才能够证实。

4.3 转录因子的相互取代

Nakagawa 等 [22] 对 Oct3/4、Sox2、*c-Myc*、*Klf4* 这四种转录因子各自家族中的其他成员分别进行了实验,结果显示除了 Oct3/4 不能被其同源蛋白 Oct1 或 Oct6 所取代,其他 3 种转录因子各自同源的家族蛋白都可以起到诱导 MEFs 为 iPS 细胞的功能,而且无论是用 *Nanog* 还是用 *Fbx* 作为报告基因来筛选 iPS 细胞都是可以的。Sox2 的作用可以被 Sox1 或 Sox3 所取代, *Klf4* 可以由 *Klf2* 或 *Klf5* 代替, *c-Myc* 也可以替换为 *n-Myc* 或 *l-Myc* [22]。

5 iPS 细胞的应用前景

5.1 iPS 细胞的应用

Hanna 等 [44] 已成功地在小鼠身上利用 iPS 细胞治疗了镰刀状细胞贫血病,这说明 iPS 细胞在功能上也具备了 ES 细胞的特性。首先,他们将小鼠的血红蛋白基因替换成了人的镰刀状细胞贫血病基因 (β^S),建立了 $h\beta^S/h\beta^S$ 纯合型的小鼠模型,以模拟镰刀状细胞贫血病的患者。然后,从 12 周龄 $h\beta^S/h\beta^S$ 雄性小鼠尾尖提取成纤维细胞,并将这些细胞用载有 Oct3/4、Sox2 和 *Klf4* 基因的反转录病毒和载有 *c-Myc* 基因的慢病毒转染。转染 16 天后,从 24 个克隆中随机选取了一个克隆用于下一步实验。为了减少因引入 *c-Myc* 而具有致瘤性的风险,他们还用编码 Cre 重组酶的腺病毒转染了 iPS 细胞,以删除慢病毒转入的 *c-Myc* 基因拷贝。结果 10 个 iPS 细胞亚克隆中有一个去掉了 *c-Myc* 基因拷贝,并用于后续实验。这些亚克隆的细胞系表达多能性的基因标记,具有正常的核型,并且可以形成畸胎瘤和嵌合体。由此证实, $h\beta^S/h\beta^S$ 成纤维细胞被诱导成了 iPS 细胞。接着,通过同源重组技术,纠正了 β^S 的突变,将 $h\beta^S/h\beta^S$ iPS 细胞改造成了表型正常的 $h\beta^A/h\beta^S$ iPS 细胞,再将其通过类胚

体(embryoid body, EB)的培养分化为造血祖细胞。最后,将这些正常的造血祖细胞注回经过射线照射的镰刀状细胞贫血病小鼠体内,使其病症得到了明显的改善(图2)。

人类iPS细胞的研究对于体细胞重编程和多种疾病发生的机制,以及利用患者自体干细胞用于临床治疗的研究都具有非常重要的意义。然而,人类iPS细胞的研究并不能代替人类ES细胞的研究,因为人类iPS细胞诱导的成功正是基于人类ES细胞和小鼠iPS细胞等研究的基础上获得的。人类ES细胞的研究将有助于人类iPS细胞研究的发展,如研究人类ES细胞的分化机制,将有助于人类iPS细胞分化的研究,以便将其应用于临床治疗。随着研究的不断深入,人类iPS细胞的研究将逐步向临床应用的方向迈进。

5.2 有待解决的问题

随着研究的不断深入,iPS细胞的来源已从成纤维细胞和皮肤细胞,扩展到了肝细胞和胃上皮细胞,甚至是成熟的B细胞。然而,其他类型的体细胞是否都可以用同样的方法诱导为iPS细胞还需要更多的实验证实。

其次,虽然采用反转录病毒将转录因子导入受体细胞使其重编程的方法已被多个研究组的实验结果所证实,但诱导后发生重编程的分子机制仍需更深入的研究。转录因子诱导的重编程是否真正重启了成纤维细胞基因组的表观遗传状态,使其达到多能干细胞的水平,还需要更新的技术手段完善检测。而且

反转录病毒载体所介导的转染是随机整合的,而只有将相应的基因整合到特定的位点,才能使体细胞重编程为iPS细胞。Real-time PCR的结果证实,Nanog-selected iPS细胞四个转录因子的基因表达水平比Fbx15-selected iPS细胞的低,反转录病毒所携带的基因在Nanog-selected iPS细胞的沉默,说明其仅是诱导所需要的,而不是维持多能性所需要的。既然诱导是瞬时的,那么这种反转录病毒系统也许可以被其他的瞬时表达系统所代替,如使用腺病毒作为载体^[20]。在载体的选择上还有很多方面有待深入的研究。

再次,反转录病毒所介导的基因整合的安全性及稳定性同样值得重视。即使不使用c-Myc,仍存在基因插入突变的可能。使用能够透过细胞膜的转录因子蛋白质或者小分子物质来诱导细胞的重编程,可以减少发生癌症的危险。Chen等^[45]发现了一种称作reversine的小分子化学物质,它可以诱导小鼠成肌细胞至更原始的多能状态,并可分化为成骨细胞和脂肪细胞。Huangfu等^[46]发现DNA甲基转移酶和组蛋白去乙酰化酶的抑制物可以提高MEFs的重编程效率。丙戊酸(valproic acid, VPA)是一种组蛋白去乙酰化酶抑制物,通过使用这种小分子物质,iPS细胞的诱导效率提高了100倍,即使在不转染c-Myc的诱导条件下,VPA也可以将诱导效率提高50倍。这说明染色质的修饰是重编程的关键步骤之一。然而,利用小分子物质诱导细胞发生重编程的方法还需要更多的研究,以便在提高iPS细胞诱导效率的同时保

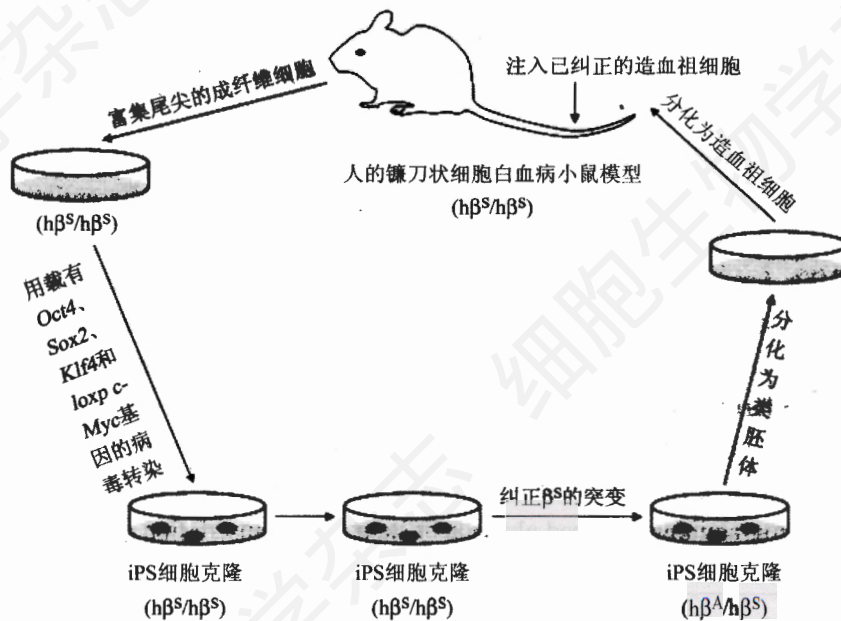


图2 用iPS细胞治疗镰刀状细胞白血病的小鼠模型(改编自Hanna等^[44])

证安全性。

最后,在诱导分化方面,除了Takahashi等^[15]成功将iPS细胞诱导为心肌细胞和神经细胞,以及Hanna等^[44]将iPS细胞分化为造血祖细胞后治疗镰刀状细胞贫血病的报道外,尚未见到将iPS细胞诱导分化为其他类型细胞的报道,那么iPS细胞的诱导条件是否与ES细胞的完全一致,还有待进一步的研究。虽然目前诱导体细胞为iPS细胞的技术还不能用于人类疾病的治疗,但随着研究的不断深入,在提高转化效率和安全性后,iPS细胞将有望应用于临床治疗。

参考文献(References)

- [1] Briggs R *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, **38**: 455
- [2] Bromhall JD. *Nature*, 1975, **258**: 719
- [3] Wilmut I *et al. Nature*, 1997, **385**: 810
- [4] Gurdon JB *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 8048
- [5] French AJ *et al. Stem Cells*, 2008, **26**: 485
- [6] Miller RA *et al. Cell*, 1976, **9**: 45
- [7] Tada M *et al. Curr Biol*, 2001, **11**: 1553
- [8] Cowan CA *et al. Science*, 2005, **309**: 1369
- [9] Do JT *et al. Stem Cells*, 2004, **22**: 941
- [10] Lewitzky M *et al. Curr Opin Biotechnol*, 2007, **18**: 467
- [11] Jiang Y *et al. Nature*, 2002, **418**: 41
- [12] Kanatsu-Shinohara M *et al. Cell*, 2004, **119**: 1001
- [13] Guan K *et al. Nature*, 2006, **440**: 1199
- [14] Takahashi K *et al. Cell*, 2006, **126**: 663
- [15] Takahashi K *et al. Cell*, 2007, **131**: 861
- [16] Yu J *et al. Science*, 2007, **318**: 1917
- [17] Hanna J *et al. Cell*, 2008, **133**: 250
- [18] Qin D *et al. Cell Res*, 2007, **17**: 959
- [19] Liao J *et al. Cell Res*, 2008, **18**: 600
- [20] Okita K *et al. Nature*, 2007, **448**: 313
- [21] Aoi T *et al. Science*, 2008, **321**: 699
- [22] Nakagawa M *et al. Nat Biotechnol*, 2007, **26**: 101
- [23] Wernig M *et al. Cell Stem Cell*, 2008, **2**: 10
- [24] Brelloch R *et al. Cell Stem Cell*, 2007, **1**: 245
- [25] Nichols J *et al. Cell*, 1998, **95**: 379
- [26] Niwa H *et al. Nat Genet*, 2000, **24**: 372
- [27] Avilion AA *et al. Genes Dev*, 2003, **17**: 126
- [28] Yamanaka S. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**: 39
- [29] Ivanova N *et al. Nature*, 2006, **442**: 533
- [30] Cartwright P *et al. Development*, 2005, **132**: 885
- [31] Rodda DJ *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 24731
- [32] Rowland BD *et al. Nat Cell Biol*, 2005, **7**: 1074
- [33] Li Y *et al. Blood*, 2005, **105**: 635
- [34] Chambers I *et al. Cell*, 2003, **113**: 643
- [35] Mitsui K *et al. Cell*, 2003, **113**: 631
- [36] Loh YH *et al. Cell Cycle*, 2008, **7**: 885
- [37] Qi H *et al. Cell Res*, 2007, **17**: 578
- [38] Maherali N *et al. Cell Stem Cell*, 2007, **1**: 55
- [39] Meissner A *et al. Nat Biotechnol*, 2007, **25**: 1177
- [40] Kuroda T *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 2475
- [41] Boyer LA *et al. Cell*, 2005, **122**: 947
- [42] Loh YH *et al. Nat Genet*, 2006, **38**: 431
- [43] Masui S *et al. Nat Cell Biol*, 2007, **9**: 625
- [44] Hanna J *et al. Science*, 2007, **318**: 1920
- [45] Chen S *et al. J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 410
- [46] Huangfu D *et al. Nat Biotechnol*, 2008, **26**: 795

Progress in Reprogramming of Somatic Cells into Pluripotent Stem Cells

Hao Chang, Tong Guo, Meng Yan, Ke Sun, Bao-Chang Zhu*

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract As a powerful tool, embryonic stem cells can not only answer the developmental biology questions concerning early stage developments of mammalian embryos, cell differentiation, regulation of gene expression, but also used in research of evaluating new drugs and cell therapy. However, the scarcity of donated human oocytes available for scientific research impedes the study on human embryonic stem cells. Seeking the substitutes for embryonic stem cells may be an ideal way to circumvent this problem. In this review, the methods of inducing mammalian somatic cells to pluripotent states were summarized. This article focused on advances in research of induction of pluripotent stem cells from somatic cells (designated as iPS cells) by defined factors, and elaborated the functions of such factors during the process. The selection strategies and identification of iPS cells as well as its prospects of research and applications were also briefly introduced.

Key words reprogramming; induced pluripotent stem cells; transcription factors; pluripotency; fibroblasts