

诱导性多能干细胞的研究进展

刘雪霞 李建远

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是通过基因转染技术将某些转录因子导入动物或人的体细胞,使体细胞直接重构成为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)样的多潜能细胞。由于其在生物医药及临床方面的广阔前景,许多研究人员都开始着手进行 iPSCs 的研究。现主要就 iPSCs 制备方法的优化及病人特异 iPSCs 系的建立,定向分化,在人类疾病中的应用进行综述。

一、iPSCs 细胞制备方法的优化及病人特异 iPSCs 系的建立

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[1] 将几个转录因子导入已分化的小鼠皮肤成纤维细胞,进而获得了类似于 ES 细胞的多能性干细胞,这一研究明确地证实了分化的细胞可以通过少数几个因子的外源导入而被重编程到具有多能性的状态。2007 年, Takahashi 和 Yu 等^[2,3] 分别报道了成功获得人的 iPSCs 系。此后,相继有多个研究小组分别将小鼠肝细胞和胃上皮细胞、胰岛细胞、终末分化的 B 淋巴细胞、神经祖细胞、神经干细胞和神经前体细胞诱导为 iPSCs^[4-8]。此外,科学家们还建立了疾病特异性或患者特异性的 iPSCs 系^[9-11]。2009 年英国、加拿大以及美国的研究团队分别报道了不借助病毒获得 iPSCs 的方法,而此前,获得 iPSCs 的方法都需要利用病毒将 4 种基因种植皮肤细胞,以此促使细胞转变^[12,13]。不论是作为载体的病毒,还是种植的基因,都具有致癌等风险。这标志着 iPSCs 研究向临床应用迈出了重要一步。同时,蛋白质和维生素 C 的应用将 iPSCs 的低诱导效率迅速提高,首次利用 iPSCs 克隆出活体实验鼠的四倍体互补试验则证明了 iPSCs 具备和 ES 同样的发育潜能^[14-17]。因此 iPSCs 在细胞形态、生长特性、干细胞标志物表达等方面与 ES 细胞非常相似,形成嵌合体动物方面也与 ES 细胞几乎完全相同。

二、iPSCs 细胞定向分化研究

iPSCs 的出现,在干细胞研究领域、表观遗传学研究领域以及生物医学研究领域都引起了强烈的反响,由于该方法解决了传统方法建立病人特异多能

干细胞的致命缺点(效率低,需要大量卵细胞;建立胚胎干细胞系需要破坏胚胎,引起道德伦理争议;目前尚无人核移植多能干细胞建系的成功报道),利用这一技术人们可以制造特定病人来源的 iPSCs,可望用“个性化”的移植来治疗诸多疾病。

2009 年,人 iPSCs 成功诱导分化成为造血细胞和内皮细胞,尽管不同的 iPSCs 系诱导分化的效率不同,但是来自新生儿、青年、成人的 iPSCs 系其分化模式类似^[18]。2009 年美国加州大学洛杉矶分校科学家首次将人体 iPSCs 诱导分化成电活跃的运动神经细胞^[19]。成功将人 iPSCs 高效分化成能分泌胰岛素的成熟胰岛细胞和肝细胞的报道也相继出现^[20-22]。

从 iPSCs 首次在实验动物中诞生,到建立方法的逐渐完善,再到 iPSCs 细胞研究在人类细胞中获得成功,最后到应用于疾病模型动物的治疗,整个过程只用了短短几年时间。就在 iPSCs 被赋予无与伦比的光芒时,威斯康星大学张素春教授^[23]研究发现, iPSCs 即便是那些不用导入外源基因诱导的 iPSCs 比对应的 ES 细胞的分化的、效率和忠实度低。而且,有资料显示:利用高通量检测手段,对 iPSCs、人 ES 细胞以及成纤维细胞的 mRNA 表达谱、miRNA 表达谱、H3 甲基化谱、基因组稳定性等等进行了比较,结果发现 iPSCs 与人 ESC 在 mRNA 表达水平存在显著差异,而且早代 iPSCs 与晚代 iPSCs 相比,这个差异更明显,相反在甲基化或小 RNA 水平,两者的差异不显著。这都意味着在把 iPSCs 可靠地用于临床环境之前还需要解决更多的问题。

三、iPSCs 在人类疾病中的应用

科学家们尝试利用病态的细胞诱导成 iPSCs,从而使这种细胞成为研究疾病的最佳模型。科学家可以直接在活细胞上甚至是嵌合体动物模型上进行疾病研究。

2009 年,科学家从一名脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)症儿童皮肤中提取皮肤成纤维细胞,并诱导成 iPSCs。SMA 是人类独有的一种疾病,人类因基因 SMN1 和 SMN2 突变而致病,啮齿动物和其他动物基因组中只有 SMN1 或 SMN2 基因中的一个,因此无法建立 SMA 疾病动物模型。这一研究成果首次在细胞水平而且用的是患者的细胞,构建

了一个活细胞疾病模型。研究小组用这类细胞诱导分化成神经组织和运动神经元,通过这些带有 SMA 病变基因的分化细胞来研究该病相关的突变蛋白的表达情况以及蛋白对药物的反应情况。

美国科学家利用 1 型糖尿病患者身上的成体细胞创建出 iPSCs,这些干细胞可重组产生与该疾病相关的所有细胞类型。由于这种疾病已在家族中流传,其遗传原因至今仍不甚明了,而 ES 细胞只能用于创建遗传基础原理比较简单的疾病模型,研究人员无法找到一种方法来确定糖尿病的特定胚胎干细胞。来自糖尿病患者身上的 iPSCs 为这种疾病建模带来了希望。研究人员可通过它建立各种细胞类型的糖尿病版本。此类模型对于 1 型糖尿病来说是非常重要的,因为通过捕获缺陷细胞并探求其功能障碍,有助于建立对该疾病病理的理解。

iPSCs 技术为疾病模型的建立提供了一个最佳的途径,研究者们试图将所有的遗传疾病都可以应用 iPSCs 技术来建立活细胞模型,通过对患者的细胞进行疾病研究,也许可以提供更具个性化的治疗方案。

四、结 语

由于 iPSCs 不涉及伦理问题,已成为再生医疗领域的研究热点。如何降低移植细胞的成瘤性和抗宿主反应,对移植细胞进行准确的体内检测和示踪,确保移植细胞在宿主体内发挥应有的功能,都是目前迫切需要研究的课题。iPSCs 的重编程机制,探索高效率的获得无外源基因插入的 iPSCs 构建方法也是目前研究者们追逐的热点。建立不同新物种的 iPSCs 库,特别是与基础研究、临床应用和农业生产密切相关的物种(大鼠、猴及猪等)的 iPSCs,对于构建这些物种的转基因模型都具有重要意义。目前不断有人提出 p53 通路以及某些基因或物质对于重编程的影响,在安全性研究上 iPSCs 的获得方法从病毒载体直至进化到化学方法。这些研究都让我们看到了 iPSCs 为人类疾病治疗所带来的希望和契机。相信不久的将来, iPSCs 技术会在人们的努力更加完善,最终有望真正造福于人类健康。

参考文献

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126 (4):663-676
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131 (5):861-872
- 3 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318 (5858):1917-1920
- 4 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
- 5 Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, 18 (12):890-894
- 6 Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133 (2):250-264
- 7 Eminli S, Utikal JS, Arnold K, *et al.* Reprogramming of neural progenitor cells into iPSCs cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 2008, 26 (10):2467-2474
- 8 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
- 9 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321 (5893):1218-1221
- 10 Park IH, Arora N, Huo H, *et al.* Disease specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134 (5):877-886
- 11 Wang Y, Jiang Y, Liu S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. *Cell Research*, 2009, 19(9):1120-1123
- 12 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
- 13 Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, 324:797-801
- 14 Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods*, 2009, 6(11):805-808
- 15 Esteban MA, Wang T, Qin B, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6:71-79
- 16 Zhao XY, Li W, Lv Z, *et al.* iPSCs cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461:86-90
- 17 Kang L, Wang J, Zhang Y, *et al.* iPSCs cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5:135-138
- 18 Chou KD, Yu J, Smuga-Otto K, *et al.* Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27(3):559-567
- 19 Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, *et al.* Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*, 2009, 27(4):806-811
- 20 Zhang D, Jiang W, Liu M, *et al.* Highly efficient differentiation of human ES cells and iPSCs cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*, 2009, 19(4):429-438
- 21 Song Z, Cai J, Liu Y, *et al.* Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Research*, 2009, 19(11):1233-1242
- 22 Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*, 2010, 51(1):297-305
- 23 Hu BY, Weick JP, Yu J, *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9):4335-4340

(收稿:2010-03-25)