

诱导性多能干细胞研究进展

石宏伟 唐其柱 张卫国 舒胜强

2006 年日本京都大学 Yamanaka 从与小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)增生分化的 24 个候选因子中筛选出 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 等 4 个转录因子将成纤维细胞诱导为 ES 类似的细胞,将其命名为 iPS 细胞(induced pluripotent stem cell)^[1]。从此,人们对 iPS 细胞的研究便迅速开展起来。

2007 年 12 月,《时代》杂志将 iPS 细胞评为 2007 年十大科学发现。

一、与细胞重编程有关的转录因子

目前与重编程有关的因子主要有 6 种:Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4、Nanog、LIN28。

1. Oct-4:Oct-4 最初在未受精的卵母细胞、精原细胞和胚胎干细胞发现,它可以在内细胞层中进行表达,进而维持未分化的多能状态,表达量增加时可以引起干细胞向 3 胚层的分化。若 Oct-4 基因缺失,胚胎干细胞会向滋养层细胞分化。

2. Sox2:Sox2 是与胚胎干细胞多能性相关的一个基因。它主要在外胚层、滋养层中表达,它与 ES 的自我更新有关,可以与 Oct-4 形成异二聚体,从而诱导干细胞分化。Sox2 可以稳定 Oct3/4 的表达,从而维持胚胎干细胞的多能状态^[2]。

3. c-Myc:c-Myc 是原癌基因,它对细胞周期、增生分化有重要影响,可以使细胞无限增生,促进细胞分裂。它的存在可以显著提高 iPS 细胞的产生效率。

4. Klf4:Klf4 可以在许多组织中得到表达,它既可以作为癌蛋白,又可以作为一种抑癌因子,通过阻断 G₁-S 期抑制细胞增生,进而促进干细胞的分化。Klf4 在体内表达过度会影响细胞的正常代谢,若表达过低会抑制细胞的正常分化。

此外还有两种转录因子:Nanog 在桑葚体和内细胞层中得以表达,它可以维持干细胞的自我更新能力,并且协调与细胞全能性相关的基因和蛋白质的表达;Lin-28 在早期胚胎发生中表达,通过增强特定 mRNA 的稳定性,从而控制干细胞的分化。

二、iPS cell 的制备方式

1. 反转录病毒或慢病毒转导:Yamanak 将 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 等 4 个转录因子将鼠成纤维细胞诱导为 iPS 细胞。这是最初的诱导方式,但是由于逆转录病毒载体易于导致插入突变而被限制应用。

2. 腺病毒转导:美国的科学家利用可以短暂表达 4 因子(Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)的未经整合的腺病毒,诱导鼠成纤维细胞和肝细胞形成 iPS 细胞,这些细胞具有重编程细胞的 DNA 甲基化特征,能表达内源多能性基因,也可以形成畸胎瘤^[3]。

3. 质粒转导:英国和加拿大的科学家利用非病毒转染的载体,它包括 c-Myc、Klf4、Oct4 和 Sox2 的编码序列以及 2A 多肽。运用这种载体可以诱导鼠和人成纤维细胞的重编程,并且诱导成功后,转基因可以立即移除。当这种载体重编程系统与 piggyBac 转座子结合之后,可以得到从胚胎成纤维细胞产生的人重编程细胞系^[4]。

4. 重组蛋白诱导:美国 Scripps 研究所等机构成功地利用重组蛋白诱导体细胞生成多能干细胞。研究人员利用 4 个转录因子的蛋白将鼠胚胎成纤维细胞诱导产生 iPS 细胞,从而形成胚胎体(EB),这些细胞在分子、形态和功能上与鼠胚胎干细胞相近。与之前的方法相比,它显得更为快捷^[5]。

5. microRNA 诱导:microRNA 是一种新发现的内源性非编码小 RNA,通过剪切 mRNA 或反转录抑制来发挥转录后调节。美国科学家研究发现,microRNA-145 的表达可以抑制人胚胎干细胞(hESC)的自我更新,阻止多能性基因的表达,并且诱导谱系限制性的分化。microRNA-145 启动子在人胚胎干细胞中与 OCT4 结合并被抑制,microRNA-145 和 OCT4、SOX2 和 KLF4 形成一个负反馈通路,从而调节 iPS 细胞分化^[6]。

此外,美国和日本的科学家比较了 iPS 细胞和胚胎干细胞基因表达水平的相似和不同之处,结果发现两者 messenger RNAs 和 microRNAs 总体的表达水平是一致的,主要差别是 12qF1 染色体上一个印记基因簇编码的 microRNA,它可以决定 iPS 细胞的发育潜力^[7]。

作者单位:430060 武汉大学人民医院(石宏伟、唐其柱、舒胜强);武汉大学基础医学院(张卫国)

通讯作者:唐其柱,电子信箱:tangqizhu@yahoo.com.cn

三、提高 iPS cell 诱导效率的方法

限制 iPS 细胞应用的主要问题是诱导效率问题。目前科学家已摸索出一些方法来提高 iPS 细胞的表达。

1. 组合不同转录因子:肖磊的研究团队研究发现,6 因子 (Oct4, Sox2, c - Myc, Klf4, Nanog 和 Lin28) 联合产生 iPS 细胞的效率比 4 因子提高 10 倍,并且产生 iPS 克隆的时间缩短了一半^[8]。北京大学邓宏魁领导的小组利用 4 个因子 (Oct4, Sox2, c - Myc, Klf4) 诱导产生 iPS 细胞,研究发现 p53 siRNA 和 UTF1 可以使 iPS 细胞产生的效率提高百倍,即使将原癌基因 c - Myc 移除也可以得到类似结果^[9]。美国和德国的科学家将病毒转导 Oct4/Klf4 并用 G9a 组蛋白甲基转移酶的抑制剂 BIX - 01294 (BIX) 诱导鼠神经前体细胞 (NPC) 产生 iPS cell,重编程效率与 4 种因子联合转导相比得到了提高^[10]。

2. 阻断抑癌基因或遗传表位:p53 可以引起一系列 DNA 损伤,包括端粒变短、DNA 修复缺陷以及外源性 DNA 损伤从而阻止细胞的重编程。2009 年,东京大学 Hyenjong Hong 研究发现缺失 p53 转导的小鼠胚胎成纤维细胞有十分之一可以转变为 iPS 细胞,效率较之以前提高百倍,p53 的缺失可以抑制鼠和人 iPS 细胞的产生;进一步研究发现 p53 ~ p21 途径可以抑制 iPS 细胞的产生^[11]。另外,西班牙一个研究团队发现在 iPS 细胞中 Ink4/Arf 表位被完全沉默,3 个转录因子 Oct4, Klf4 and Sox2 在细胞之中表达后很快 Ink4/Arf 表位得到了抑制,所以 Ink4/Arf 表位的抑制可以提高 iPS 细胞的数目^[12]。

3. 采用新的转导体系:美国的一组科学家利用一个可以表达干细胞盒 (STEMCCA) 的单一慢病毒载体 (pHAGE - STEMCCA) 从成年实验鼠睾丸细胞中获取了与胚胎干细胞性质相似的干细胞,尽管病毒的转导效率较低,但是重编程的效率提高了 10 倍^[13]。此外,美国科学家采用一种可诱导脱氧土霉素的慢病毒系统将人成纤维细胞和角质化细胞诱导为 iPS 细胞,其重编程效率比直接诱导提高了百倍^[14]。

4. 改变细胞来源:裴端卿及其团队发现小鼠脑膜细胞易诱导为 iPS 细胞,且不需筛选即能完全发生重编程,从而拓宽了 iPS 细胞的应用范围^[15]。美国的研究人员发现脂肪干细胞更容易转化为 iPS 细胞,且安全性比皮肤成纤维细胞更高。值得重视的是,中国的科学家同样利用病毒介导 4 因子,从孕妇产前诊断羊水细胞建立起 iPS 细胞,重编程的时间目前为人类诱导多能干细胞中最短的 (仅 6 天),这为进一步研

究重编程机制提供理想的细胞来源。

5. 转座子诱导:英国及加拿大的研究人员利用“转位子”将制造 iPS 细胞所需的 4 个基因同时导入人类胎儿的纤维母细胞,成功地制造出 iPS 细胞,与使用病毒研制的比较,效率高逾 25 倍^[4]。

6. 其他的新型方式:日本科学家在利用人皮肤细胞诱导产生 iPS 细胞时,将培养环境的氧浓度降低到 5%,细胞生成的效率可成倍增加。值得一提的是,许多研究在培养过程中加入特定的促生长因子:如促进干细胞诱导和分化的因子如维生素 C、组蛋白脱乙酰基抑制剂丙戊酸 VPA、成纤维细胞因子 (FGF2) 或者白血病抑制因子 (LIF),进而改变重编程细胞特性,提高重编程效率。

四、iPS 细胞在再生医学的作用

iPS 细胞除了可以进行基础研究和药物筛选,还可以诱导组织器官再生,同时避免了宿主的免疫排斥反应,因而在再生医学上具有良好的应用前景。

1. iPS 在动物疾病模型中的应用:2007 年,Whitehead 研究所利用取自人类镰状细胞性贫血的模型小鼠皮肤成纤维细胞,通过导入 Oct4、Sox2、Klf4 及 c - Myc 获得 iPS 细胞,将其诱导为造血干细胞,移植后可治疗动物模型的镰状细胞性贫血。该研究所另将小鼠 iPS 细胞诱导分化为神经前体细胞和多巴胺能神经元,从而显著改善帕金森病小鼠模型运动功能^[16]。美国的一组科学家利用病毒将 Ngn3、Pdx1 和 Mafa 导入小鼠体内胰腺外分泌细胞,将其成功地转变成了可生产胰岛素的胰岛 β 细胞^[17]。此外,京都大学科学家最近发现:将鼠皮肤细胞重编程为 iPS 细胞可以得到听神经祖细胞,从而改善听力障碍^[18]。

2. 具有临床实用意义的 iPS 细胞的生成及分化:临床上目前尚未使用诱导性多能干细胞进行治疗,但是有临床价值的 iPS 细胞已经被成功诱导。这种细胞具有与病人一致的基因型,因此不会发生免疫排斥;此外可以方便了解并修饰人体的固有缺陷。因此具有极大的临床运用价值。2008 年 7 月,美国科学家将肌萎缩侧索硬化症 (ALS) 老年患者的皮肤细胞诱导为 iPS 细胞并分化成运动神经元。这是科学家首次把人类患者的皮肤细胞改造成多能干细胞。家族性自主神经功能障碍 (FD) 是一个罕见但是致命的外周神经系统疾病,它主要是由于 IKBKAP 基因点突变引起的,美国的一组科学家从病人身上诱导出 iPS cell,并且将其分化为外周神经元。基因表达显示离体条件下 IKBKAP 存在组织特异性剪切,病人神经嵴

前体细胞 IKBKAP 转录水平特别低。采用药物治疗后可以逆转错误剪切,改良神经元的分化和迁移,神经元功能也得到了改善^[19]。

五、展 望

美国加州大学的科学家发现了可以实时观测重编程的方式,这使得进一步研究细胞重编程的机制成为可能。因此,实时观测 iPS 的诱导过程,观察分化过程中基因和蛋白表达的差异具有十分诱人的前景。microRNA 在干细胞的分化过程中扮演着重要的角色,通过调节 mRNA 表达来发挥转录后调控功能,利用微阵列分析发现:在人胚胎干细胞和诱导性多能干细胞中,许多 microRNA 表达上调,如 MiR - 302 和 17 ~ 92 簇等;而 MiR - 371/372/373 则在两种多功能细胞中表达有差异,microRNA 为进一步研究 iPS 细胞重编程机制提供了有效的工具,因而在表观遗传学上具有极大的研究价值^[20]。

综上,iPS 细胞具有特殊的优势:iPS 细胞可为人们逐渐深入了解细胞重编程的机制、探讨体细胞的潜在功能提供新的途径,同时它也在再生医学上具有广阔的应用前景。国内的相关研究较少,这为我们研究细胞重编程乃至再生医学提供新的机遇。

参考文献

- 1 Takahashi K, and S Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126: 663 - 676
- 2 Masui S, *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9 (6): 625 - 635
- 3 Stadtfeld M, *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration[J]. Science, 2008, 322: 945 - 949
- 4 Woltjen K, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2009, 458: 766 - 770
- 5 Zhou H Y, *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(5): 381 - 384
- 6 Xu N, *et al.* MicroRNA - 145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and

- Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells[J]. Cell, 2009, 137: 647 - 658
- 7 Stadtfeld M, *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2010, 465: 175 - 181
- 8 Liao J, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors[J]. Cell Res, 2008, 18(5): 600 - 603
- 9 Zhao Y, *et al.* Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSC Generation[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(6): 475 - 479
- 10 Shi Y, *et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3 (1): 525 - 528
- 11 Hong H, *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53 - p21 pathway[J]. Nature, 2009, 460: 1132 - 1135
- 12 Ko, K, *et al.* Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1): 87 - 96
- 13 Sommer C A, *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette[J]. Stem Cells, 2009, 27 (3): 543 - 549
- 14 Maherali N, *et al.* A high - efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 3(3): 340 - 345
- 15 Qin, D, *et al.* Mouse meningiocytes express Sox2 and yield high efficiency of chimeras after nuclear reprogramming with exogenous factors [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 33730 - 33735
- 16 Wernig M, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105: 5856 - 5861
- 17 Zhou, Q, *et al.* In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta - cells[J]. Nature, 2008, 455: 627 - 632
- 18 Nishimura K, *et al.* Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea[J]. Neuroreport, 2009, 20(14): 1250 - 1254
- 19 Lee G, *et al.* Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient - specific iPSCs[J]. Nature, 2009, 461: 402 - 406
- 20 Wilson K D, *et al.* MicroRNA profiling of human - induced pluripotent stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(5): 749 - 758

(收稿:2010 - 06 - 14)

(上接第 131 页)

- 2 Whitehead ML, Lonsbury - Martin BL, Martin GK. Evidence for two discrete sources of 2f1 - f2 distortion - product otoacoustic emission in rabbit. II: Differential physiological vulnerability [J]. J Acoust Soc Am, 1992, 92: 2662 - 2682
- 3 Stavroulaki P, Nikolopoulos TP, Psarommatis I, *et al.* Hearing evaluation with distortion - product otoacoustic emissions in young patients undergoing haemodialysis [J]. Clin Otolaryngol, 2001, 26(3): 235 - 242
- 4 James AL, Mount RJ, Harrison RV. Contralateral suppression of DPOAE measured in real time[J]. Clin Otolaryngol, 2002, 27(2): 106 - 112
- 5 Kim SH, Frisina DR, Frisina RD. Effects of age on contralateral sup-

pression of distortion product otoacoustic emissions in human listeners with normal hearing[J]. Audiol Neurotol, 2002, 7(6): 348 - 357

- 6 徐进,刘铤,郭连生,等. 自发性耳声发射与耳蜗传出调控的关系探讨[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 2001, 36(6): 436 - 440
- 7 薛飞,王锦玲,孟美娟,等. 听神经病患者畸变产物耳声发射的特征[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2003, 11(4): 258 - 260
- 8 王锦玲,石力,薛飞,等. 听神经病听力学特征及病损部位分析[J]. 听力学及言语疾病杂志, 2007, 15(2): 89 - 97
- 9 Sliwinski - Kowalska M, Kotylo P. Occupational exposure to noise decreases otoacoustic emission efferent suppression [J]. Int J Audiol, 2002, 41(2): 113 - 119

(收稿:2010 - 06 - 29)