

DOI:10.3969/cmba.j.issn.1673-713X.2009.03.001

iPS 细胞的生成——转录因子的 决定性作用

张文成, 李艳华, 裴雪涛

胚胎干细胞 (Embryonic Stem cells, ESCs) 具有分化全能性和自我更新能力, 其全能性的维持取决于多种转录因子、表观修饰因子等组成的错综复杂的网络, 在这其中 Oct4、Sox2、Nanog 被认为是核心调控因子。2006 年, 日本京都大学 Yamanaka 实验室将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 导入小鼠胚胎成纤维细胞 (embryonic fibroblasts, MEFs) 中, 成功的获得了与小鼠 ESCs 在表型、生长特性、基因表达和分化潜能等方面高度相似的小鼠诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells)^[1]。随着 iPS 细胞的研究逐渐白热化, 其在疾病模型的建立、药物筛选以及细胞替代治疗等方面的应用前景也越发为世人所追捧。虽然建立 iPS 细胞的技术环节看起来简单易行, 解决生成 iPS 细胞的低效率及临床应用的安全隐患等问题还需待以时日。通过对 ESCs 中全能性相关的转录因子的作用机制研究的借鉴, 来深入了解它们在 iPS 细胞产生过程中的调控作用, 将有助于我们更好的找到解决这些问题的方法。

1 ESCs 全能性相关的转录因子

在 ESCs 的全能性调控网络中, Oct4、Sox2、Nanog 作为核心转录因子, 有关的研究在近几十年内层出不穷。Oct4 是仅在发育早期的胚胎、生殖细胞和未分化的 ESCs 中表达的全能性基因。在 ESCs 的命运决定中, Oct4 通过与其它的一些外部信号协作共同维持 ESCs 的全能性。在目前发现的 Oct4 的靶基因中 Sox2 作为调控 ESCs 全能性的基因也备受瞩目。一般情况下, Sox2 通过与 Oct4 结合, 共同调控靶基因位点来维持 ESCs 的全能性, 但是其对 ESCs 分化过程细胞命运决定的作用并不依赖于 Oct4。Nanog 最早发现可以维持体外无 LIF 或无滋养层细胞培养条件下小鼠 ESCs 的全能性, 才开始作为 ESCs 全能性维持的重要调节子而进行研究。从发育角度来讲, Nanog 会直到囊胚期才开始在早期胚胎内细胞团 (inner cell mass,

ICM) 中高表达, 所以有人推知 Nanog 在胚胎发育早期起到了维持 Oct4 启动的 ICM 的全能性的作用。有关 Nanog 对 ESCs 全能性维持的机理的研究还处于初级阶段, 目前认为 Nanog 可反作用于下游 Gata4、Gata6 等分化相关基因, 在 ESCs 全能性的维持中起着枢纽作用。除 Oct4、Sox2、Nanog 外, FoxD3 近年也被证实在胚胎发育的早期发挥着重要作用, 只是对 FoxD3 在 ESCs 中的功能目前研究的还不多, 但可以确定的是 FoxD3 与 Oct4、Nanog 一样只在全能性细胞中表达。

Ivanova 等^[2]人利用 RNAi 介导的基因敲除技术, 对可能在 ESCs 全能性的维持中起决定性作用的候选基因进行大规模的筛选和鉴定, 最终得到 8 个维持 ESCs 未分化状态所必需的基因, 包括 Nanog、Oct4、Sox2、Tbx3、Esrrb、Tcl1、Dppa4 以及 Mm.343880。在 ESCs 的体外培养过程中, 这些转录因子分别或者共同作用, 通过抑制促 ESCs 分化基因的表达或活化 ESCs 全能性基因的表达来维持 ESCs 的全能性。

2 iPS 细胞诱导生成中转录因子的作用

从之前的研究中我们可以得出, 在 ESCs 向特定细胞系分化的过程中, 通常会伴随着基因表达谱和染色质结构的改变, 并以此来保证分化细胞特定状态的长期稳定性以及精确的细胞命运决定。而体细胞核移植、细胞融合等体细胞重编程技术的实现则证实了这种分化和发育并非不可逆。iPS 细胞的产生进一步说明, 重编程完全可以通过在体细胞内导入 Oct4、Sox2、Nanog 等 ESCs 全能性相关的转录因子实现。除 Oct4、Sox2、Nanog 外, 虽然 Klf4、c-Myc^[3-4]、Lin28^[5]以及 Wnt 基因家族成员等并非为 iPS 细胞诱导生成所必需的基因, 但也被

作者单位: 100850 北京, 中国人民解放军军事医学科学院野战输血研究所

通讯作者: 裴雪涛, Email: peixt@nic.bmj.ac.cn

收稿日期: 2009-03-23

证实在这个过程中起到重要作用。

在众多 iPS 细胞的研究当中, Oct4 一直被认为是重编程过程中不可缺少的转录因子, 在重编程起始过程中起到重要作用。而 Sox2 往往作为 Oct4 的协作因子对 ESCs 中的下游靶基因进行调控, 全基因组定位分析结果显示出 2 个转录因子在调控靶基因中存在着普遍的互作。Shi 等^[6]人对转录因子各家族成员之间的错综复杂的关系和作用进行研究, 发现除 Oct4 外 Sox2、Klf4 和 c-Myc 在重编程过程中的作用都可被同一蛋白家族的其它成员所替代, 因此得出 Sox2、Klf4 和 c-Myc 可能并非是重编程过程所必需的因子。

目前, 对重编程过程中 Klf4 和 c-Myc 的作用有 2 种假设: 其一, Klf4 和 c-Myc 使成熟细胞产生肿瘤样转变, 因此赋予 MEFs 无限增殖以及 ESCs 样的快速生长能力; 其二, c-Myc 可对 MEFs 的染色质进行修饰, 致使重编程因子更容易与重编程中所需的基因结合^[1]。而 Klf4 通过对成体细胞内 Lefty1 转录的促进作用, 来协同 Oct4 和 Sox2 起始体细胞内 ESCs 关键基因的表达。

目前对与外源转录因子和内源基因的表达的研究普遍认为, 外源因子可以激活内源性 Oct4 与 Sox2 的表达, 而且一旦内源性的 Oct4 与 Sox2 得以表达, 就会迅速在细胞内形成一个自我调节环路用以维持 iPS 细胞的多能性状态, 而不再需要外源基因的诱导与维持。Masui 等^[7]人的研究得出通过在重编程过程中过表达 Oct4, 就可以免去 Sox2 的使用, 因而 Oct4 可能是重编程过程中唯一不可缺少的转录因子。但此结论在 iPS 细胞诱导生成中是否确切, 还有待于深入探讨。

除了筛选的重编程转录因子之外, Thomson 实验室通过 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 4 个转录因子也同样获得了人的 iPS 细胞。可见在此过程中 Nanog 可完全代替 Klf4 和 c-Myc 的重编程作用, 原因有 2 点: 其一, Klf4 通过对 p53 的抑制作用的来调节细胞增殖, 而 p53 是 Nanog 的负调控因子, 所以重编程过程中, Klf4 可能起到活化 Nanog 的作用; 其二, Klf4 和 Oct4、Sox2 一起共同激活小鼠 ESCs 内的 lefty1 核心启动子, 而 Nanog 则在核转录网络中与 Oct4 和 Sox2 有广泛的协同作用。因此, Nanog 有可能是通过与 Oct4 和 Sox2 的协同作用在重编程的初始阶段来替代 Klf4 的一些功能。由此我们可以推知, Nanog 在 iPS 细胞生成中可能起到了增加早期重编程细

胞的成活率的作用。

在 ESCs 全能性以及自我更新能力维持中起到重要作用的 Wnt 基因家族近期也被发现参与体细胞的重编程。在 Merrill^[8]和 Marson 等^[9]人的研究中, 通过在重编程体系中添加 Wnt 信号, 激活 Wnt 家族的经典途径中的 β -catenin 或者适当抑制其磷酸激酶 GSK-3 β 的活性, 可以明显提高无 c-Myc 的 3 因子体系的诱导效率。虽然目前对 β -catenin 下游作用因子还知之甚少, 但对最有可能的候选基因的筛选已经初显端倪。癌细胞中的 c-Myc 是 Tcf- β -catenin 的下游基因, 而 Wnt3a 可有效地替代重编程中 c-Myc 的作用的原因, 可能与之可以提高靶细胞内 c-Myc 的表达有关。而 Nanog 之所以可以作为重编程因子, 也可能与它本身做为 Tcf3 的下游基因有关。基于这些研究我们可以得出 β -catenin 虽然参与诱导重编程, 但是诱导过程中必须有其它 ESCs 相关因子的参与。对 ESCs 中 Wnt- β -catenin 通路的研究可以解释 Wnt 基因家族参与重编程的现象。Bover 等^[10]人的研究显示, 在 ESCs 看家基因中, 大约有一半为 Oct4、Sox2 和 Nanog 的共同靶基因, 其中也包括有编码参与信号 Wnt 信号通路的基因。因此我们不难得出, Wnt 基因家族可能是通过 Oct4、Sox2 和 Nanog 的下游基因的作用在 iPS 细胞生成的过程行使其重编程功能。

3 转录因子在 ESCs 以及 iPS 细胞中作用的比较

借助 Sridharan 等^[11]人的研究, 我们可以对 ESCs 和 iPS 细胞中转录因子的作用进行比较讨论。他们通过全基因组分析技术, 对 ESCs、iPS 细胞以及部分重编程细胞中的 4 个转录因子 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的启动子条带进行比较, 结果发现: ESCs 和 iPS 细胞中 4 个转录因子的靶基因都是高度重叠的, 且 iPS 细胞内的 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 的结合模式与 ESCs 内的类似, 这提示了我们 4 个转录因子在诱导多能性产生的时候结合的是一组保守的靶基因; 在部分重编程的细胞中, 如果缺少 Nanog 或者任何一个其它的转录因子, 都无法获得 ESCs 特异的结合模式, 所以说部分重编程的细胞不能称之为 iPS 细胞; 在 ESCs 和 iPS 细胞中, 转录因子对靶基因的表达调控依赖于特异的 H3K4/K27 组蛋白甲基化模式, 而这种模式却为部分重编程细胞所缺

乏。由此可见,发生完全重编程的 iPS 细胞内的 4 因子结合方式与它们在 ESCs 中的结合方式几乎完全相似,只是结合的力度有所不同,这也可以解释为什么 iPS 细胞并不能完全等同于 ESCs。

4 问题与展望

作为干细胞研究的里程碑,iPS 细胞的问世为备受争议的 ESCs 的应用提出新的解决方案,但 iPS 细胞真正用于组织、细胞替代治疗仍需待以时日,以下存在的问题还有待于更好的解决与思考:

成瘤性: iPS 细胞获取中对 c-Myc 的应用增加了其在应用中的成瘤性风险,虽然在没有 c-Myc 存在的情况下也可以获得 iPS 细胞,而且成瘤的几率会大大降低,但是获得 iPS 细胞的效率也大打折扣。进一步寻找其它启动体细胞重编程的转录因子组合是今后研究的一个方向。

重编程的低效率: 获得 iPS 细胞效率低是 iPS 细胞生成技术上的最大问题,目前看来,iPS 细胞获得的效率会受以下两方面影响:
靶细胞的发育阶段: 发育上比较原始的细胞如神经干细胞其自身内源性高表达一些全能性相关的转录因子,更容易被重编程;
外源性引入的全能性相关转录因子的表达强度及时序可能影响重编程的效率: 不同载体介导转录因子表达、进而启动靶细胞生成 iPS 细胞的效率是不同的,这可能与外源转录因子的表达强度有关;此外,这些转录因子发挥作用的时间表及先后顺序可能也起到关键的作用,瞬时转染靶基因启动重编程的效率极低可能与靶基因不能较长时间、持续相当强度表达有关。要解决这一问题,需要我们深入研究 iPS 细胞重编程的机制,如哪一个或者哪几个因子起始了重编程的程序,以及起始后重编程作用如何传递等。

介导转录因子表达的载体: iPS 细胞的获得可以通过病毒载体介导或脂质体转染完成,对转录因子导入的方式不同可以直接影响到 iPS 细胞的获得效率。早期利用逆转录病毒或者慢病毒载体存在随机性插入突变、致瘤的风险,而且在 iPS 细胞生成后外源性基因会持续性高表达,使诱导分化无法进行。采用 Cre 系统以及 PB 转座子技术从基

因组中剔除插入的外源基因可以很好的解决这一问题。选择腺病毒载体或脂质体介导外源基因表达从而启动体细胞重编程,可以避免剔除病毒基因组的繁琐工作。由于瞬时转染获得 iPS 细胞的效率很低,可以考虑通过加入小分子化合物或者其它条件培养基提高 iPS 细胞生成效率。

综上,iPS 细胞的建立及其相关研究进展令人兴奋,相关的机制和应用研究为我们展示了干细胞与再生医学的一个全新领域。但这项技术真正用于疾病的干细胞治疗还有相当长的路要走,如何提高 iPS 细胞生成的效率、解决其临床应用的安全性、重编程过程中转录因子的调控机制等问题还需进一步深入研究。

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] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 2006, 442(7102):533-538.
- [3] 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.
- [4] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, 451(7175):141-146.
- [5] 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.
- [6] Shi Y, Desponts C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5):568-574.
- [7] Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6):625-635.
- [8] Merrill BJ. Develop-WNTs in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5):465-466.
- [9] Marson A, Foreman R, Chevalier B, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2):132-135.
- [10] Bover L A, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, 122(6):947-956.
- [11] Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*, 2009, 136(2):364-377.