

诱导多潜能干细胞

左长清¹, 马文丽¹, 郑文岭^{1,2}

¹南方医科大学基因工程研究所 广州市, 510515

²华南基因组研究中心 广州市, 510800

【摘要】 通过病毒载体导入 4 个外源转录因子 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf 或者 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 入体细胞, 可以诱导产生具有胚胎干细胞特性相似的诱导多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS)。iPS 在疾病治疗和药物研究等领域具有非常重要的应用前景, 但是目前存在诱导效率低以及致肿瘤性等缺点, 采用改良方法诱导产生 iPS 是将来研究的重点。

【关键词】 诱导多潜能干细胞; 胚胎干细胞; 转录因子

【中图分类号】 Q813

Perspectives: Induced Pluripotent Stem Cells

ZUO Changqing¹, MA Wenli¹, ZHENG Wenling^{1,2}

¹Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China

²Southern China Genomics Research Center, Guangzhou, 510800, China

【Abstract】 Transduction of four factors, for instance, Oct4, Sox2, c-Myc and Klf or Oct4, Sox2, Nanog and Lin28 into somatic cells through viral vector, is sufficient to reprogram human somatic cells into induced pluripotent stem cells (iPS) that exhibit the essential characteristics of embryonic stem (ES) cells. iPS cells possess significant application perspective in disease treatment and drug development. At present, however, there still exist some shortcomings to be conquered, for instance, low induction efficiency and high tumorigenicity. Therefore, improvement of iPS induction strategy would be of great importance in the near future.

【Key words】 induced pluripotent stem cells; embryonic stem cells; transcription factor

尽管人胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 有着巨大的医学应用潜力, 但围绕该研究的伦理道德问题一直争论不休。因此, 长期以来, 科学家一直探索是否可以不通过人胚, 获得具有和胚胎干细胞特性相同或相似的多潜能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS)。近年, 通过采用病毒转导少数基因进入小鼠和人类体细胞, 并成功诱导产生具有与胚胎干细胞特性相似的多潜能干细胞, 将干细胞研究推向了一个全新的领域。

1 iPS 的研究策略及命名

2006年 8月, 日本京都大学 Takahashi 等^[1]在

《Cell》上宣布: 将外源基因导入完全分化的体细胞, 可以诱导产生 iPS, 首次证明了外源因子可以使体细胞重编程 (reprogramming)。他们将此诱导细胞命名为诱导多潜能干细胞, 即 iPS。具体研究策略如下: 首先, 将双选择标记 β_{geo} (neo 用于 G418 筛选, βGal 用于显影) 基因盒同源重组到小鼠 *Fbx15* 基因位点, 使 β_{geo} 受内源性 *Fbx15* 启动子控制, 由于 *Fbx15* 只在 ESC 中表达, 所以来源于 *Fbx15*^{β_{geo}/β_{geo}} 小鼠的体细胞由于缺乏 ES 特性, 不能在 G418 中生长。采用逆转录病毒将 24 个候选基因单个导入 *Fbx15*^{β_{geo}/β_{geo}} 小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEFs), 无 G418 抵抗克隆。将 24 个基因全部导入以上 MEFs 时, 可以筛选到 22 个 G418 抵抗克隆, 其中 5 个克隆与 ES 细胞形状相似。重复实验同样获得 ES 形状相似细胞, 同时发现, ES 细胞标记基因表达。采用逐一淘

资助项目: 广东省重点实验室建设基金 (No. 2004B60144)

通讯作者: 马文丽 (E-mail: wenli@fimmu.com)

This work was supported by a grant from Key Laboratory Construction Foundation of Guangdong Province (No. 2004B60144)

Corresponding author: MA Wenli (E-mail: wenli@fimmu.com)

汰策略, 将 24 个因子逐一取消, 最终研究筛选出 4 个因子, 即 *Oct4*, *Sox2*, *cMyc*, *Klf4*。此 4 个因子在 MEFs 细胞诱导产生 iPS 细胞中具有十分重要的作用。进一步证明以上 4 个因子诱导产生的 iPS 细胞在细胞形态、生长特性、标志物、形成畸胎瘤等方面与小鼠 ES 细胞非常相似, 因而将其命名为 iPS 细胞。

由于 Takahashi 等^[1]采用 *Fbx15* 作为筛选标记, 虽然产生的 iPS 细胞和 ES 细胞具有较多的共性, 但在基因表达谱、DNA 甲基化方式及形成嵌合体动物方面却不同于小鼠 ES 细胞。由于 *Nanog* 与多潜能性更加紧密相关, 因此, 2007 年, Okita 等^[2]用 *Nanog* 代替 *Fbx15* 进行筛选: 先产生带有 *Nanog*-GFP-IRES-Puro 的转基因小鼠, 然后将上述筛选的 4 个因子转入 *Nanog*-GFP-IRES-Puro⁺ MEFs, 采用嘌呤霉素进行筛选, 最终得到了 *Nanog* 阳性的 iPS 细胞系。研究发现, 该 iPS 细胞不仅在细胞形态、生长状况、标志物表达、移植到小鼠皮下可形成畸胎瘤等方面与小鼠 ES 细胞非常相似, 而且在 DNA 甲基化方式、基因表达谱、形成嵌合体动物等方面也与小鼠 ES 细胞非常相似。说明采用 *Nanog* 筛选能得到和 ES 细胞更相似的 iPS 细胞 (图 1)。其他研究小组^[3,4]也相继证明, 上述 Yamanaka 4 因子诱导产生 iPS 细胞, 形态和功能与小鼠 ES 非常相似。

broblast HDF) 转导效率的策略: 用慢病毒先将小鼠逆转录病毒受体 *Slc7a1* 转入 HDF, 再用亲嗜性逆转录病毒将 GFP 转入 HDF, 并发现此方法对 HDF 细胞的转导效率和小鼠成纤维细胞相似。将上述 4 个因子转入 HDF 中, 成功获得了 iPS 细胞。除了 HDF, 原代 HDF 样滑膜细胞和新生儿 HDF 的细胞系也可被诱导成为 iPS 细胞。进一步证明 iPS 细胞在细胞形态、增殖能力、表面抗原标志、基因表达谱、多潜能干细胞特异性基因的表现遗传学、端粒酶活性等方面与人类 ES 细胞相似, 并且在体外培养和畸胎瘤形成中均可分化为 3 个胚层细胞类型。Yu 等^[9]也报道了成功诱导体细胞转化为 iPS 的研究结果, 该研究者的策略是使用慢病毒代替逆转录病毒作为载体, 从 14 个候选基因中筛选出 *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Lin28* 4 个基因转入胚胎成纤维细胞和新生儿包皮成纤维细胞系。进一步证明诱导的 iPS 细胞和人类 ES 细胞特性相似: 具有正常的核型、表达端粒酶活性、表达 ES 细胞表面标记和基因谱, 分化成 3 胚层的潜能。除以上两组研究报道外, Park 等^[10]采用与 Takahashi 等^[8]相同的 4 因子, 同样采用逆转录病毒载体, 诱导胎儿、新生儿及成人原代成纤维细胞转变成 iPS 细胞。他们还发现 *Oct4* 和 *Sox2* 在诱导 iPS 细胞过程中是必需的, 而 *Klf4* 和 *cMyc* 的作用是提高诱导的效率。

2 iPS 的应用现状

Hanna 等^[11]利用人类镰状细胞性贫血的小鼠动物模型, 取 12 周龄尾尖部皮肤的成纤维细胞, 通过逆转录病毒导入 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 及慢病毒导入 *cmyc* 基因, 获得自体 iPS 细胞。为了减少因 *cmyc* 基因导入诱导肿瘤的产生, 采用编码 cre 重组酶的腺病毒删除 iPS 细胞中的慢病毒转导 *cmyc* 拷贝, 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进行纠正后, 将体外培养的自体 iPS 细胞诱导为造血干细胞, 移植后治疗动物模型的镰状细胞性贫血, 产生较好的效果。Wemig 等^[12]报道, 采用 4 因子重编程鼠成纤维细胞产生 iPS 细胞, 体外培养能够有效地分化成神经元前体细胞, 产生神经元和胶质细胞。此 iPS 细胞移植进入小鼠胎脑, 细胞能移行进入不同脑区, 分化成胶质和不同亚型的神经元, 并且具有良好的功能和活性。进一步研究证明可以明显改善成年 Parkinson 病动物模型鼠的行为。Nakao 等^[13]采用 iPS 可以评估 *azum an ides* 的体外抗血管生成活性。

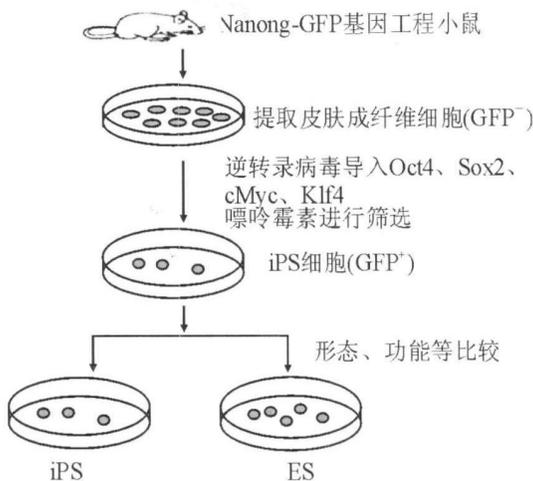


图 1 iPS 诱导流程

除小鼠成纤维细胞能诱导成 iPS 细胞, 目前已有研究发现小鼠的肝脏细胞和胃上皮细胞^[5]、B 淋巴细胞^[6]、胰腺 β 细胞^[7] 等, 同样可以诱导产生 iPS 细胞。

以上研究均是在小鼠细胞中进行的, 但在人体细胞能产生同样的效果吗? 2007 年, Takahashi 等^[8]报道了可提高人成纤维细胞 (human dermal fi-

此外, 人类疾病特异性 iPSC 细胞, 可用于制备疾病的新模型, 研究疾病发生机理以及药物药理毒理研究^[8-10]。

3 iPSC 的几个问题和现有解决策略

3.1 提高 iPSC 诱导效率的方法

目前研究表明, 采用不同 4 因子组合诱导产生 iPSC 的效率均较低 (约 1/10 000), 如何提高效率是具有很大的挑战性。几个研究组对此进行了探索。在诱导产生 iPSC 过程中, Liao 等^[14]采用 6 个因子 (Oct4, Nanog, Sox2, Lin28, c-Myc 和 Klf4) 能够诱导体细胞产生 iPSC, 并且效率比单用 4 因子提高 10.4 倍。Mali 等^[15]通过补充附加基因或生物活性分子如 SV40 T 抗原能明显增加 4 个重编程基因诱导成人或胚胎成纤维细胞效率 23~70 倍, 而且人胚胎干细胞 (hES) 样克隆出现的时间也提早 1~2 周。Huang 等^[16]发现组蛋白脱乙酰基酶抑制剂丙戊酸 (VPA), 可以使 4 因子重编程 iPSC 效率提高 100 倍左右, 同时也可使 3 因子 (除去 c-Myc) 重编程效率提高约 50 倍。这是迄今为止 iPSC 重编程效率最高的方法。

3.2 用其他方式诱导产生 iPSC

由于采用病毒载体导致肿瘤发生的潜在风险, 安全性方面一直受到重视, 虽然有报道不用 c-Myc^[17], 只采用 3 个因子, 同样可以诱导人类和小鼠成纤维细胞产生 iPSC 细胞, 而且相比转导 4 个因子的 iPSC 致肿瘤性明显减少, 但产生 iPSC 细胞的效率明显降低, 产生的时间明显延长。但是除了 c-Myc, 其他因子同样与部分肿瘤有关: 如 Oct3/4 与膀胱癌相关^[18], Sox2 与胃癌有关^[19], Klf4 在鳞状细胞癌高表达^[20], 而 Myc 与多种肿瘤相关。是否可以直接采用药物、化学小分子或细胞因子诱导多潜能干细胞呢? Rajasinh 等^[21]发现小鼠胚胎干细胞的无细胞提取液能够促使终末分化的成纤维细胞 NIH3T3 产生多潜能干细胞, 表明不引入基因和病毒载体, 通过目前未知的因子同样可以诱导产生 iPSC。

Sh 等^[22]发现, G9a 组蛋白甲基转移酶的小分子抑制剂 BIX-01294 (BIX) 能使神经祖细胞 (neural progenitor cells, NPCs, 一种内源性低表达 Sox2 的细胞) 诱导为多潜能干细胞的效率提高。他们研究发现, 当转导 Oct3/4-Klf4 两个基因进入 NPCs 时, 每 3.5×10^4 个 NPCs 可以诱导产生 (1.5 ± 0.7) 个 iPSC 克隆; 当转导 Oct3/4-Klf4-Sox2/c-Myc 4 个基因进入 NPCs 时, 能获得 (8.0 ± 1.4)

个 iPSC 克隆; 但联合采用 Oct3/4-Klf4 和 BIX 时, 能获得 (12.0 ± 1.41) 个 iPSC 克隆。因此, BIX 能够替代病毒转导的 c-myc 和 Sox2 的功能, 明显减少了基因操作。进一步实验证实: 采用病毒转导 Oct3/4-Klf4 联合应用 BIX 处理产生的 iPSC 与采用原始 4 因子产生的 iPSC 细胞具有相似的特性。由于在此之前, iPSC 细胞都采用了 Oct3/4 和 Sox2 基因, 那么是否诱导产生多潜能干细胞必须内源性或者外源性表达某种特定的转录因子? 为了回答此问题, 采用 Klf4, Sox2 和 c-Myc (KSM) 3 因子联合小分子 BIX 处理 NPCs 细胞, 同样可以诱导产生 iPSC, 只是效率比较低。但当不加用小分子 BIX 处理时, 上述 3 因子不能诱导产生 iPSC, 由此说明在缺乏外源性转导 Oct3/4 的情况下, 同样可以采用小分子等方式诱导产生 iPSC。较低的重编程效率给 iPSC 的筛选带来一定的难度, 目前主要有两种方法来筛选 iPSC 细胞: ① 遗传学方法, 即采用报告基因方法, 这种方法需要对细胞进行遗传学修饰; ② 根据克隆形态直接分离, 但这种方法工作繁重, 可靠性差, 只有小部分筛选的克隆证明是 iPSC 细胞。作者发现在形态学筛选时, 加入 MEK 小分子抑制剂 PD0325901 能更多更纯的得到 iPSC 细胞。因此这些研究提示, 进一步筛选小分子物质可以减少癌基因转导的风险, 提高转导效率, 而且目前的研究均采用 gain-of-function 的方法诱导产生 iPSC 细胞, 小分子化学抑制剂使用表明 loss-of-function 方法也可能是一种有效的产生 iPSC 细胞的策略, 并且, 有望可能完全不采用任何基因操作, 简单加入一些化学物质或细胞因子就可以诱导产生多潜能干细胞, 减少基因操作带来的风险和难度。

3.3 iPSC 诱导效率低的原因

诱导效率低的原因可能有两种^[23]: ① 病毒整合进入特定的基因组位置; ② 可能存在一些少量的细胞群体, 如干细胞或祖细胞, 而只有这类细胞能重编程成 iPSC 细胞。但是, 采用 4 因子可以诱导小鼠肝细胞和胃上皮细胞产生 iPSC 细胞^[5], 并且证明产生的 iPSC 细胞具有 ES 细胞相同的基因表达谱, 而且不需要逆转录病毒整合到基因组的特定位点。

针对目前诱导的原始细胞群体的异质性和重编程干细胞的低效率, 争论认为只有原始细胞群体中非常稀有的细胞类型, 如成体干细胞能够诱导产生 iPSC, 而终末分化的细胞不能重编程, Stadtfeld 等^[7]采用终末分化的胰腺 β 细胞转入 Oct4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 4 个因子, 结果诱导产生出 iPSC 细胞, 从而证明终末分化细胞可以诱导产生出 iPSC 细胞。

重编程并不局限于一定的细胞类型和分化状态。因此, 诱导效率低的真正原因有待进一步的研究。

虽然以上各研究组均报道诱导的 iPS 细胞和 ES 细胞不能区分 (indistinguishable), 相似 (similar) 等, 虽然形态, 生长特性等相似, 或者更高层次证明基因组, 甲基化等也相似, 但是蛋白组, microRNA 等水平是否也相似呢? 这值得进一步探讨。

总之, 诱导多潜能干细胞给沉浸在伦理和法律争论中的胚胎干细胞研究提出了一个全新的研究思路, 但是真正要用于临床, 给人类造福, 还有很长的路要走。

参考文献

- [1] TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell* 2006 126(4): 663-676.
- [2] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-317.
- [3] WERNIG M, MEISSNER A, FOREMAN R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state[J]. *Nature*, 2007, 448(7151): 318-324.
- [4] MAHERALIN, SRIDHARAN R, XIE W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution[J]. *Cell Stem Cell* 2007, 1(1): 55-70.
- [5] AOIT, YAE K, NAKAGAWA M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells[J]. *Science*, 2008, 321(5889): 699-702.
- [6] HANNA J, MARKOULAKIS, SCHORDERET P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency[J]. *Cell* 2008 133(2): 250-264.
- [7] STADTFELD M, BRENNAND K, HOCHEDLINGER K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells[J]. *Curr Biol* 2008, 18(12): 890-894.
- [8] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKIM, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell* 2007 131(5): 861-872.
- [9] YU J, VODYANKIN M A, SMUGA-OTTO K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. *Science*, 2007 318(5858): 1917-1920.
- [10] PARK IH, ZHAO R, WEST J A, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. *Nature* 2008 451(7174): 141-146.
- [11] HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKIS, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with PS cells generated from autologous skin[J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-1923.
- [12] WERNIG M, ZHAO J P, PRUSZAK J et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008 105(15): 5856-5861.
- [13] NAKAO Y, NARAZAKI G, HOSHINO T, et al. Evaluation of antiangiogenic activity of azumamide by the in vitro vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (PS) cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett* 2008 18(9): 2982-2984.
- [14] LIAO J, WU Z, WANG Y, 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.
- [15] MALIP, YE Z, HOMMOND H H, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts[J]. *Stem Cells* 2008 26(8): 1998-2005.
- [16] HUANGFU D, MAEHR R, GUO W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small molecule compounds[J]. *Nat Biotechnol* 2008, 26(7): 795-797.
- [17] NAKAGAWA M, KOYANAGI M, TANABE K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without myc from mouse and human fibroblasts[J]. *Nat Biotechnol* 2008 26(1): 101-106.
- [18] ATLASIY, MOWLA S J, ZIAEE S A, et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer[J]. *Int J Cancer* 2007, 120(7): 1598-1602.
- [19] LIX L, EISHIY, BAIY Q, et al. Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma[J]. *Int J Oncol* 2004, 24(2): 257-263.
- [20] FOSTER K W, LIU Z, NAIL C D, et al. Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia[J]. *Oncogene* 2005 24(9): 1491-1500.
- [21] RAJASINGH J, LAMBERS E, HAMADA H, et al. Cell-free embryonic stem cell extract-mediated derivation of multipotent stem cells from NIH3T3 fibroblasts for functional and anatomical ischemic tissue repair[J]. *Circ Res* 2008, 102(11): e107-117.
- [22] SHI Y, DO J T, DESPONT C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell* 2008, 2(6): 525-528.
- [23] DURCOVA-HILLS G. Induced reprogramming of human somatic cells into pluripotency: a new way how to generate pluripotent stem cells[J]. *Differentiation* 2008 76(4): 323-235.

(2008-07-08 收稿)