

文章编号: 1000-1336(2010)03-0387-04

诱导多能干细胞的体细胞重编程方法与应用前景

吴南 冯华

第三军医大学西南医院神经外科, 重庆 400038

摘要: 体细胞重编程(somatic reprogramming)是指已分化的体细胞在特定条件下,其生长和发育的程序重新转变,成为另一型细胞,特别是恢复到全能性状态,逆转成诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)的过程。多能干细胞能在体内外分化成几乎所有类型的细胞,具有很高的理论研究价值。将已分化的人体细胞程序重排为多能状态可以产生对病人和疾病的特异性干细胞。本文介绍用转录因子的异位表达,介导产生诱导多能干细胞的方法和可能的危险性以及有较高安全性的“2A 肽法”。目前,iPS 技术还未进入临床应用,但已有一些有希望的尝试。

关键词: 诱导多能干细胞(iPS); 体细胞重编程; 转录因子异位表达; 2A 肽法

中图分类号: Q291

体细胞重编程是指已分化的体细胞在特定条件下,生长和发育程序重新转变,成为另一型细胞,特别是被逆转成诱导多能干细胞的过程。多能干细胞类似原始胚胎干细胞,能自我更新,在体内外能分化成几乎所有类型的细胞,在再生医学等领域有巨大的应用潜力。体细胞核重新排序实际上是指将一种细胞的基因表达转换为另一种类型的基因表达的过程,是生物学和医学领域中的重大突破^[1,2]。本文就其研究方法和应用前景的进展作一简要介绍。

1. iPS的制备方法

1.1 四个转录因子的方法

用Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc这四个转录因子可从成人皮肤成纤维细胞产生iPS,也可从小鼠的体细胞产生iPS,并在种系中传播下去。iPS在形态学、增殖、表面抗原、基因表达、多能细胞特异性基因的表观遗传状态以及端粒酶活性方面都和人类胚胎干细胞相似^[3]。将体细胞核转移至哺乳动物卵母细胞中,可使细胞中的反式作用因子将该体细胞核重新编程成为未分化状态。Yu等^[4]报道,用Oct4、Sox2、Nanog和Lin28这四个因子足以使人体细胞重新编程

成为iPS,呈现胚胎干细胞的特征。这种iPS可用于制造新的疾病模型、对药物研究和移植医学具有重要的应用价值。从人体活检取得标本开始到完成重新编程约需两个月时间^[5]。应用不插入宿主基因组但短时表达重组Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc的腺病毒也能够将小鼠的成纤维细胞和肝细胞诱导成多能干细胞。这种腺病毒诱导多能干细胞(adeno-iPS),能表达内源性多能性基因、形成畸胎瘤和许多不同的组织,为产生和研究病人特异性干细胞提供了好的方法。

1.2 排除应用病毒为运载体体的方法

最初尝试用病毒作为载体,是用其运送程序重排因子。用这样产生的iPS细胞进行治疗,由于有许多前病毒的整合体,可能有插入突变的危险。例如,在早期研究中,科学家需要用4个独立的病毒(每个病毒对应1个重组基因)才能将四个转录因子(Oct4、Sox2、c-Myc和Klf4)的基因转移到细胞的DNA中。这4个基因一旦被激活,细胞将会从成年状态分化成类似于胚胎的状态。而且这些病毒可能插入细胞基因组中任何一个地方,进而有可能引发癌基因(oncogene)的表达。

1.2.1 c-Myc排除方法 Yamanaka等^[7]不用Myc逆转录病毒,同样获得了高质量的诱导多能干细胞,而且不会产生肿瘤。以前要获得人的iPS,需要将载体

收稿日期: 2009-11-28

作者简介: 吴南(1971-),男,博士,副教授,副主任医师, E-mail: wnyfx@tmmu.edu.cn; 冯华(1963-),男,博士,教授,主任医师,通讯作者, E-mail: fenghua8888@yahoo.com.cn

也整合进基因组中；但实际上外源性序列重排因子在基因组中的整合插入并非必需。俞君英等^[8]报道，应用非插入型的附加载体获得人的iPS，在除去附加体后，人的iPS完全没有了载体和转基因的序列，并在繁殖和发育上与人类胚胎干细胞无异。这证明人体细胞重排并不需要外源性序列重排因子在基因组中的整合插入或持续存在，从而消除了将人iPS应用于临床的障碍。

1.2.2 2A肽法 最近Carey等^[9]采用称为2A肽类聚合物的一小段DNA可使上述四种重新编程基因串联起来。当细胞中产生蛋白质，这个串联基因的DNA被阅读时，依次产生2A肽所串联的蛋白质，直至制造出所有四个基因编码的蛋白质。这样，从单个启动子可以进行高效的多顺反子表达。应用这种多顺反子载体，他们制造了仅有一个拷贝的多顺反子载体的iPS细胞，而不是许多病毒的整合体，这是一个巨大的进步。例如进行基因打靶时，要将单个转基因插入某个确定位置时，用本法就更为安全。他们应用此法已能从人角质形成细胞产生人的多能干细胞系，证明单个多顺反子病毒即能重新排序人的体细胞。

此外，用一些已确定的因子通过能自我裂解的2A肽序列融合成为单个开放读码框，形成一个简单的慢病毒程序重排系统^[10]。这种多顺反子表达系统可有效地产生iPS，有正常的核型，在形态学和基因表达方面与胚胎干细胞相似。

用2A肽非病毒转染法转染多蛋白质表达的载体能重新排序人和小鼠的成纤维细胞，建立了从人胚胎成纤维细胞进行程序重排的各种人细胞系，具有多能性活性的表达^[11]。在这个系统中iPS基因组的改变很少，并能完全去除外源性程序重排因子，能有效地应用于再生医学、药物筛选以及建立疾病模型等。

1.2.3 PiggyBac转座法 PiggyBac(PB)转座子来源于飞蛾甘蓝尺蠖中的DNA转座子，能携带多个基因，可在人和小鼠的细胞中高效转座。PB转座子全长2472个碱基，两端含有13个碱基的反向末端重复，并编码一个含594个氨基酸残基的转座酶。PB转座子可同时携带多个基因，并允许它们在不同的整合位点表达。用PB转座法能将成纤维细胞重新排序成为诱导多能干细胞。用PB系统可进行无缝切除，因

此可以将所得的iPS细胞系中的某些PB插入切除。此外，还可以从小鼠的iPS细胞系中不留任何痕迹地除去重新排序因子^[12]。

1.3 大鼠iPS制备

在遗传学研究和人类疾病模型的制造中，至今尚未见应用大鼠胚胎干细胞(ESC)，因为大鼠ESC一般很难获得。Jing等^[13]用大鼠耳朵的成纤维细胞或骨髓细胞产生大鼠iPS。与ESC相比较，大鼠iPS有以下优点：(1)能够长期增殖而不发生分化，保持其多能性；(2)能保持正常的核型；(3)在活体内能形成全部三个胚层的组织。这些性质使得大鼠iPS能用于同源重组，从而使大鼠成为人类疾病模型的首选，例如用来加入或排除某个基因。

1.4 细胞核直接重新排序的方法

终末分化的细胞也可通过细胞核直接重新排序而转变为另一型细胞(不通过多能干细胞)从而获得多能性。在文献中很多例子说明是可行的。例如将皮肤成纤维细胞和视网膜上皮细胞转变为肌细胞。再如，成熟B淋巴细胞通过髓细胞样转录因子 α -CCAAT/增强子结合蛋白(CCATT/enhancer-binding protein α)的异位表达或者通过特异性地敲除B细胞转录因子Pax5也可重新排序，从而证明了终末分化的细胞亦可通过细胞核重新排序而获得多能性^[14]。

2. iPS的应用研究

iPS不需要人类卵子，也不需要制造或破坏胚胎，因此在应用中避开了伦理和技术障碍。在早期研究中，Takahashi等^[3]将4个基因转入小鼠肝脏细胞和胃黏膜细胞，培育出诱导多能干细胞。与原来用皮肤细胞培育出的iPS细胞相比，这种细胞引发癌症的几率大为下降。此后，他们又用小鼠皮肤成纤维细胞制成的iPS成功制造出视网膜感光细胞，有可能用于治疗视网膜色素变性等疾病。Lowry等^[15]应用上述四个转录因子从人皮肤成纤维细胞产生iPS，所产生的细胞系与人胚胎干细胞在形态学上没有差别，染色体组型分析也证明人细胞重新排序不会引起染色体的异常，可以用来替代病人本身的多能干细胞，进行自体细胞的替代治疗。

3. iPS在临床治疗中的应用

3.1 脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)

脊髓性肌萎缩症是一种遗传性神经疾病，是由于残存的运动神经元1存活基因(survival motor neu-

ron 1 gene, SMN1)突变引起的一种常染色体隐性遗传病; SMN1 蛋白的表达降低引起了下 α -运动神经元的退化。临床上 SMA 1 型病人常在出生后 6 个月时出现症状,在两岁左右死亡。最近, Ebert 等^[16]从一个病儿的皮肤成纤维细胞产生出 iPS, 这些细胞在培养时生长旺盛, 保持疾病的基因型, 并能产生有选择性缺陷的运动神经元, 有可能用 SMA 的治疗。

3.2 肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)

ALS 伴有运动神经元的损伤, 为试图治疗 ALS, Dimos 等^[17]曾从一名 82 岁的女性 ALS 患者获得 iPS。这类患者的特异性 iPS 具有胚胎干细胞的性质, 能成功地分化为运动神经元, 也有可能用于 ALS 的治疗。

3.3 糖尿病

研究表明, 成熟的肝脏可以作为有功能的胰腺内分泌的来源, 这种由肝脏到胰腺的再发育过程是由有胰腺转录作用的异位表达因子和分化因子所诱导的, 据此而获得的 iPS 可以使糖尿病人成为自身治疗用组织的供体, 从而避开了晚期糖尿病病人需进行的异体移植治疗^[18]。Qiao 等^[19]报道, 用三种转录因子(Ngn3/Neurog3, Pdx1和Mafa)可将已分化的外分泌细胞重新排序为类似的 β -细胞, 这些细胞具有 β -细胞的全部功能, 并能重新塑造血管系统和分泌胰岛素。

3.4 神经系统疾病和损伤

神经系统的疾病和损伤, 其治疗方法基本上是姑息性的。人 iPS 能够分化成运动神经元, 具有电生理活性, 所以成为神经科学研究的热点。迄今在文献中已有几十种方法可将人 iPS 分化成为各式各样的神经细胞, 包括: 多巴胺能神经元、视网膜神经元、脊髓腹运动神经元以及少突神经胶质祖细胞等^[20,21]。Schwartz 等^[22]描述了这些方法, 并将其分为五类: (1)从原始物质开始; (2)去除多能性; (3)分化成为神经系统细胞; (4)维持神经系统的细胞并进行扩增; (5)神经元和神经胶质的分化^[23]。此外, Soldner 等^[24]将 5 名特发性帕金森氏征患者的成纤维细胞成功地培育成为多巴胺神经元细胞, 有望为帕金森氏征的治疗带来福音。

参 考 文 献

[1] Zaehres H et al. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*, 2007, 131: 834-835

- [2] Gurdon JB et al. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, 2008, 322: 1811-1815
- [3] Takahashi K et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-676
- [4] Yu J et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318: 1917-1920
- [5] Park IH et al. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2008, 3: 1180-1186
- [6] Stadtfeld M et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322: 945-949
- [7] Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif*, 2008, 41: 51-56
- [8] Yu J et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, 324: 797-801
- [9] Carey BW et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 157-162
- [10] Shao L et al. Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Res*, 2009, 19: 296-306
- [11] Kaji K et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458: 771-775
- [12] Ding S et al. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 2005, 122: 473-483
- [13] Liao J et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 11-15
- [14] Hanna J et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133: 250-264
- [15] Lowry WE et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 2883-2888
- [16] Ebert AD et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457: 277-280
- [17] Dimos JT et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321: 1218-1221
- [18] Meivar-Levy I et al. Regenerative medicine: using liver to generate pancreas for treating diabetes. *Isr Med Assoc J*, 2006, 8: 430-434
- [19] Qiao Z et al. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, 455: 627-632
- [20] Dimos JT et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321: 1218-21
- [21] Luo Y et al. How useful are stem cells in PD therapy? *Parkinsonism Relat Disord*, 2009, 3: 171-175

- [22] Schwartz PH et al. Differentiation of neural lineage cells from human pluripotent stem cells. *Methods*, 2008, 45: 142-158
- [23] Karumbayaram S et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*, 2009, 27: 806-811
- [24] Soldner F et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, 136: 964-977

Somatic cell reprogramming

Nan Wu, Hua Feng

Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract The reprogramming of somatic cell means transformation of the differentiated somatic cell into another type of cell, especially generation of induced pluripotent stem cell (iPS) by retrograde development of differentiated somatic cells *in vivo* and *in vitro*. Theoretically, iPS has very high research value. With the aid of iPS, one can generate patient-specific pluripotent stem cell. In this review, the methods for generation of iPS, and the potential risk, as well as the so called "2A peptide" method, which is much safer, are reviewed. Although the iPS technique has not been used in clinic at present, successful applications are expected in the near future.

Key words induced pluripotent stem cell (iPS); somatic reprogramming; ectopic expression of transcriptional factors; 2A peptide