

诱导多能干细胞研究现状及展望

毛润一 王璟综述 林云锋审校

(口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学 成都 610041)

[摘要] Takahashi 和 Yamanaka 通过瞬时高表达外源性的转录因子, 首次得到了诱导多能干细胞, 这种具有多潜能细胞特性细胞的诞生, 预示着一种新的干细胞研究方法的到来。本文就诱导多能干细胞的发展历程及最新进展作一综述。

[关键词] 诱导多能干细胞; 体细胞; 重编程; 胚胎干细胞;

[中图分类号] Q 813 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.04.025

Research progress on induced pluripotent stem cells Mao Runyi, Wang Jing, Lin Yunfeng. (State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Takahashi and Yamanaka got induced pluripotent stem cells through the instantaneous high expression exogenous transcription factor, and the cells have much potential traits and indicate a new stem cell research way. The development and the latest progress of induced pluripotent stem cells are reviewed in this paper.

[Key words] induced pluripotent stem cell; somatic cell; reprogramming; embryonic stem cell

2006年, Takahashi 和 Yamanaka^[1]首次通过瞬时高表达外源性的转录因子获取了诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC), 并且成功建立了 iPSC 系。研究采用逐一淘汰制, 从 24 个因子中筛选出 4 个基因——Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4, 通过反转录病毒将其导入小鼠成纤维细胞中获取了 iPSC。随后许多研究人员^[2-4]也通过该方法获得了 iPSC, Choi 等^[5]通过导入 Oct4、Sox2、Nanog、Lin28 也同样获取了 iPSC。Qin 等^[6]于 2007 年利用反转录病毒将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 导入未经遗传修饰的小鼠成纤维细胞, 诱导其成为 iPSC。近年来, 通过导入不同因子得到的 iPSC 为生物医药领域开拓了新的研究方向。

1 iPSC 细胞的研究方向以及发展历程

1.1 多种体细胞的重编程

2007 年, Takahashi 等^[7]将人皮肤成纤维细胞重编程为 iPSC, 揭开了人体细胞重编程的序幕。此后不同研究小组将人的间充质干细胞^[8]、肺成纤维细胞^[9]、骨髓间质细胞^[10]、脂肪干细胞^[11]、肿瘤细胞^[12]、血液 B 淋巴细胞^[13]、牙胚细胞^[14]重编程

后得到 iPSC。

许多研究表明, 从任何一个胚层发育分化而来的细胞都可重编程成为 iPSC, 而且不同阶段的细胞重编程的难易程度是不同的, 在间充质干细胞等分化程度较低的诱导过程中, 重编程回档易于已处于终末分化的体细胞; 血细胞和脂肪干细胞因其取材来源较为容易, 能提供足够大量的细胞来源, 是 iPSC 较为理想的供体细胞。

1.2 因子导入方式

研究者们利用特定的小分子化合物, 或者改变因子导入方式, 改善并提高了 iPSC 的安全性以及低重编程率。迄今为止, 此研究领域已取得了许多突破性的进展。Stadtfeld 等^[15]利用腺病毒作为载体转运 4 个因子成功得到了 iPSC, 使得这些因子在短时间内高表达, 且在之后不介入永久整合; 另外, 他们还使用转座子方法成功制备了无病毒整合的较为安全的 iPSC。Okita 等^[16]采用 2 种质粒分别携带了 4 个因子进行了共转染, 此方法利用质粒转染的特点, 剔除了整合的 4 个因子, 获得了没有病毒基因的 iPSC。另外, 也有研究者^[12]使用 microRNA 等方法进行因子的导入研究。

1.3 小分子化合物的选择

体细胞在重编程的过程中可以加入一些小分子化合物替代某个因子, 以此来提高 iPSC 的重编

[收稿日期] 2011-12-27; [修回日期] 2012-03-14

[作者简介] 毛润一(1991—), 男, 上海人, 学士

[通讯作者] 林云锋, Tel: 18980430599

程率,通过研究这些小分子化合物,对于提高 iPSC 病毒转染时病毒基因整合的安全性也有着十分积极的意义。Shi等^[17]将 G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂 BIX-01294 和 Oct4、Klf4 进行组合后,大大提高了神经干细胞的重编程率。Mikkelsen等^[18]通过研究证实,5-氮(杂)胞苷可以提高重编程的效率。Huangfu等^[19]则认为,丙戊酸比 5-氮(杂)胞苷的作用更佳。Esteban等^[20]证实了丙戊酸与维生素 C 可大大提高 iPSC 的重编程效率,比 Takahashi 等^[1]首次报道时的重编程率提高了近 500 倍。

目前对体细胞重编程的分子机制尚未明了,通过引入 iPSC,有望深入小分子化合物信号通路的相关研究,更好地理解存在于重编程中深层次的调控信号网络,有利于推动干细胞的研究发展。

1.4 iPSC 的筛选鉴定

iPSC 的筛选鉴定是得到 iPSC 非常重要的一个环节,如何判定细胞克隆已成为研究的热点,细胞是否具有胚胎干细胞多能性一般从以下 6 个步骤来鉴定:1) iPSC 多潜能性细胞表面标志物;2) 体外定向分化能力;3) 裸鼠畸胎瘤;4) 嵌合体的形成;5) 进入生殖系遗传的能力;6) 胚胎干细胞的形成胚胎发育能力。

Takahashi等^[7]研究获取的 iPSC 细胞,因为筛选策略问题,虽然表达了多潜能性细胞的表面标记物,但无法得到嵌合体鼠。对于 iPSC 的鉴定和筛选的关键,集中于后三步的鉴定内容上,只有真正使 iPSC 通过了这三步的鉴定,才能从科学的角度确定 iPSC 是否具有胚胎干细胞的特性。2009 年以前,在 iPSC 的鉴定上,嵌合体的形成和进入生殖系遗传的能力的鉴定已成为研究者们鉴定 iPSC 的必须步骤,但是对于公认的 iPSC 鉴定的金标准——四倍体小鼠的鉴定研究,一直停滞不前。2009 年,Zhao等^[21]通过 iPSC 成功繁育出了四倍体小鼠“小小”,这成为了继“多莉”羊之后又一个里程碑式的干细胞研究成果。

2 疾病特异性诱导多能干细胞

Dimos等^[22]提取了家族型肌萎缩性脊髓侧索硬化症患者的上皮细胞,将其重编程为 iPSC,此种 iPSC 拥有疾病特异性的特点,不仅通过定向诱导分化成为了患者运动神经元的共体细胞,而且还可为寻找药物靶点提供具有疾病特异性的细胞来源。Soldner等^[23]诱导 iPSC 向多巴胺神经元分化,有望为帕金森患者带来一种新的有效的治疗方法。

此外, Park 等^[10]建立了多种遗传性疾病的特异性 iPSC 系,包括亨廷顿病、唐氏综合征等。

Chamberlain 等^[24]通过重编程的方法,已为某些遗传性疾病患者的细胞建立了拥有疾病特异性的 iPSC 系。疾病特异性 iPSC 系的问世为人们提供了一个个性化的治疗途径,使得不同患者的个体化药物研究有了一定的理论基础,并且通过对某种疾病特异性细胞的研究,可以了解疾病的发生机制。

3 iPSC 的应用前景展望

干细胞近些年一直是学术界研究的热点,但其涉足伦理、宗教问题等,受到了很大的阻力;而 iPSC 因其没有伦理问题和免疫排斥反应,拥有较好的应用前景。

近年来 iPSC 在利用各种体细胞重编程技术上已经比较成熟,热点从前期的提高重编程率、重编程不同体细胞,逐渐转变为对重编程机制、细胞受体、组蛋白修饰等的研究上来。近年的研究发现,重编程后的细胞在组蛋白甲基化水平上与已分化细胞有着很大的不同, iPSC 拥有低水平甲基化^[25]的特点,这暗示着重编程在基因水平上的改变。重编程不同的体细胞、肿瘤研究以及基因层面上细胞信号通路机制的研究将会成为日后重要的方向。

iPSC 的发现为构建患者-疾病-特异性多能干细胞^[26]开辟了一条新途径,研究人类 iPSC 有助于了解疾病的发生机制和筛选药物。iPSC 的应用正逐渐转向临床方面,基于 iPSC 的再生治疗模型^[27-28]逐渐建立,关于心脏肌细胞、骨骼肌细胞的再生修复已取得了良好的效果^[29]。

4 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] Maherali N, 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.
- [4] 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.

- [5] Choi KD, Yu J, Smuga-Otto K, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(3) :559-567.
- [6] Qin D, Li W, Zhang J, et al. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4[J]. *Cell Res*, 2007, 17(11) :959-962.
- [7] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5) :861-872.
- [8] Wernig M, Lengner CJ, Hanna J, et al. A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(8) :916-924.
- [9] Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, 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.
- [10] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells[J]. *Cell*, 2008, 134(5) :877-886.
- [11] Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(37) :15720-15725.
- [12] Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state[J]. *RNA*, 2008, 14(10) :2115-2124.
- [13] Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1) :11-14.
- [14] Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, et al. Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking[J]. *J Dent Res*, 2010, 89(8) :773-778.
- [15] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration[J]. *Science*, 2008, 322(5903) :945-949.
- [16] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors[J]. *Science*, 2008, 322(5903) :949-953.
- [17] Shi Y, Do JT, Despons 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.
- [18] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis[J]. *Nature*, 2008, 454(7200) :49-55.
- [19] 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.
- [20] Esteban MA, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1) :71-79.
- [21] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation[J]. *Nature*, 2009, 461(7260) :86-90.
- [22] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons[J]. *Science*, 2008, 321(5893) :1218-1221.
- [23] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors[J]. *Cell*, 2009, 136(5) :964-977.
- [24] Chamberlain SJ, Li XJ, Lalande M. Induced pluripotent stem(iPS) cells as *in vitro* models of human neurogenetic disorders[J]. *Neurogenetics*, 2008, 9(4) :227-235.
- [25] Yoshida Y, Yamanaka S. Recent stem cell advances : Induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration[J]. *Circulation*, 2010, 122(1) :80-87.
- [26] Hilfiker A, Kasper C, Hass R, et al. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine : Is there a future for transplantation[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2011, 396(4) :489-497.
- [27] Serwold T, Hochedlinger K, Swindle J, et al. T-cell receptor-driven lymphomagenesis in mice derived from a reprogrammed T cell[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(44) :18939-18943.
- [28] Loh YH, Agarwal S, Park IH, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood[J]. *Blood*, 2009, 113(22) :5476-5479.
- [29] Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs[J]. *Nature*, 2009, 461(7262) :402-406.

(本文编辑 张玉楠)