

特异性多能转录因子及其作用的研究进展

张芳 周晓燕综述 韦曦审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院·口腔医学研究所 广州 510055)

[摘要] 将自胚胎干细胞中筛选出的 oct-4、sox-2、c-myc、klf-4 四种基因组合转入体细胞,可获得与胚胎干细胞类似的诱导性多能干细胞。牙髓干细胞取材简单,尝试利用特异性多能转录因子将其重编程为与胚胎干细胞类似的诱导性多能干细胞,可为牙组织工程提供优质的种子细胞。本文就特异性多能转录因子的结构和功能、在体细胞去分化中的作用、在肿瘤发生中的作用、在牙髓细胞中的表达及其意义等作一综述。

[关键词] 去分化; 牙髓干细胞; 多能干细胞; 多能转录因子

[中图分类号] Q 786 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.02.024

Research progress on defined pluripotent transcription factors and their functions ZHANG Fang, ZHOU Xiao-yan, WEI Xi. (Research Institute of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Viral introduction of four genes (oct-4, sox-2, c-myc, klf-4) in committed somatic cells is sufficient to yield induced pluripotent stem (iPS) cells that resemble embryonic stem cells. Since dental pulp stem cell (DPSC) can be easily obtained from extracted teeth, attempts to reprogram DPSC to iPS cells by defined pluripotent transcription factors may provide a more advantageous seed cell source for tooth regeneration. This review mainly covers the structures and function of the defined pluripotent transcription factors, the roles they play in de-differentiation of somatic cell and in tumor genesis, and their expressions and significances in dental pulp cell.

[Key words] de-differentiation; dental pulp stem cell; pluripotent stem cell; pluripotent transcription factor

2006 年, Takahashi 等^[1]将筛选自胚胎干细胞中的 oct-4、sox-2、c-myc、klf-4 四种基因组合转入小鼠的胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF), 获得与胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)具有类似形态、扩增能力、表面抗原、基因表达谱和甲基化位点等特征的细胞,遂将其命名为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS 细胞), 自此揭开了体细胞去分化研究的序幕。体细胞去分化后所获得的患者特异的干细胞群体, 既避免了与 ESC 有关的伦理争议和免疫排斥问题, 又具有广阔的应用前景。

1 多能转录因子的结构和功能

Oct-4 蛋白主要由 ESC 分泌, 属于 POU 家族成员。由于其能与 DNA 八聚体基序(octamer mo-

tiD) ATGCAAAT 结合, 而被命名为八聚体结合蛋白(octamer binding protein), 即 Oct-4^[2]。Sox-2 是高速泳动族盒家族 10 个亚族中的 B 亚族成员^[3], 可与 Oct-4 组成调节性复合体, 协同调控动物早期胚胎发育中一些重要基因的表达, 如抑制滋养外胚层分化相关基因 cdx-2 的表达^[4]。c-myc 为原癌基因, 其强制表达可阻断细胞分化、诱导程序性细胞死亡。klf-4 既是原癌基因又是抑癌基因, 在 ESC 和多种分化细胞中均有表达, 对组织的发生、分化和功能维持具有重要的作用。

在这些转录因子中, Oct-4 对维持未分化细胞的自我更新至关重要。Oct-4 主要表达于胚胎发育过程中的外胚层细胞、原始生殖细胞、胚胎干细胞和胚胎生殖细胞^[5], 当胚泡着床细胞开始分化时, 经过一系列抑制性修饰被灭活, 其表达下调。Oct-4 通过抑制分化相关基因, 调节干性基因表达, 维持细胞的多能状态, 对胚胎干细胞自我更新具有精确的调节作用^[6]。2009 年, Hannan 等^[7]在以人 ESC 中 HES-2 和 3 通过反转录病毒载体转染抑制 Oct-4 的表达时发现, oct-4 基因沉默

[收稿日期] 2010-01-27; **[修回日期]** 2010-06-15

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(09ykpy-62); 广东省自然科学基金资助项目(9151008901000199)

[作者简介] 张芳(1982—), 女, 山东人, 硕士

[通讯作者] 韦曦, Tel: 020-83741753

的细胞系向脂肪前体细胞分化。

近来有研究发现: Oct-4 在体细胞中有表达, 对体细胞的自我更新有调节作用; 但也有学者认为, Oct-4 对体细胞功能的维持并非必不可少。Lengner等^[8]对文献报道有 Oct-4 表达的组织, 采用 Cre-lox 法使 oct-4 基因特异性失活, 结果组织代谢和损伤修复未受到明显的影响。原因在于 Oct-4 在这些组织中虽有表达, 但表达量较低, 故对组织的作用不显著; 此外, 基因组中 oct-4 假体^[9]的存在以及 POU 家族其他成员的影响, 也会干扰 Oct-4 的检测结果。Zangrossi 等^[10]发现: Oct-4 表达于终末分化的外周血单核细胞, 但在核中不与染色体上的八聚体序列结合。因而推测 Oct-4 在胚胎细胞与体细胞中的作用可能不同, 其确切机制尚有待于进一步的研究。

2 多能转录因子在体细胞去分化中的作用

oct-4、sox-2、c-myc、klf-4 四种基因经典组合转染 MEF, 揭开了体细胞去分化为 iPS 细胞的研究新篇章。随后, Aoi 等^[11-12]相继将鼠的肝细胞、胃上皮细胞和胰脏 β 细胞等终末分化细胞去分化为多能干细胞。2008 年, Park 等^[13]将人的成纤维细胞去分化为 iPS 细胞, 掀起了再生医学领域的研究热潮。

目前, 体细胞去分化的确切机制尚未明了。oct-4 等外源性基因的转入旨在激活内源性的多能干细胞转录因子, 获得稳定的 iPS 细胞, 然而内源性因子激活的时间还不确定。2008 年, Brambrink 等^[14]用含有四环素操纵子的反转录病毒载体将 oct-4、sox-2、c-myc、klf-4 四种基因组合转入 MEF, 通过多西环素与四环素操纵子联合控制外源性转录因子的表达时间, 检测去分化过程中碱性磷酸酶、特殊阶段胚胎抗原 (stage-specific embryonic antigen, SSEA) -1、内源性 Oct-4 和 Nanog 的表达。结果外源性转录因子至少需异位表达 12~16 d 才能有效诱导内源性 Oct-4 和 Nanog 的表达, 使成纤维细胞去分化为 iPS 细胞。其中, SSEA-1 表达是细胞去分化的中间状态, 若此时去除多西环素使外源性转录基因表达关闭, 去分化过程将中止, 细胞形态恢复为成纤维细胞状。

鉴于将反转录病毒整合到体细胞基因组中可诱发插入突变, 原癌基因 c-myc 和 klf-4 异位激活具有致癌性等问题, 有学者尝试用更为安全有效的方法去诱导体细胞去分化。小鼠神经干细胞

(neural stem cell, NSC) 表达 Sox-2, 后者可维持 NSC 的自我更新和抑制分化^[15]。Eminli 等^[16]采用复制缺陷的多西环素诱导系统, 将 oct-4、c-myc 和 klf-4 三种基因转入小鼠的 NSC, 获得的 iPS 细胞高于经典的四基因组合。他们认为: NSC 中内源性的 Sox-2 足以协同其他因子协同完成重编程; 相反, Sox-2 过表达反而降低细胞去分化效率, 即体细胞去分化受到多能转录因子表达水平的精确调控。

Kim 等^[17]在将 oct-4、sox-2、c-myc、klf-4 形成不同组合转染 NSC 后发现, 转入 oct-4/c-myc 或 oct-4/klf-4 双因子即可获得 iPS 细胞。即若成体干细胞表达适当水平的多能干细胞转录因子, 转入的外源性因子种类可减少。Grinnell 等^[18]将 oct-4 转入小鼠皮肤基底的滤泡间充质细胞, 利用单个转录因子成功地诱导体细胞去分化。Kim 等^[19]基因转染 oct-4, 亦将 NSC 去分化为类似 ESC 的多能干细胞。虽然, oct-4 单因子诱导的去分化率为双因子组合转染的 1/10, 却接近经典的四基因组合转染 MEF 的去分化率^[20]。这说明 oct-4 对于体细胞重编程必不可少, 其他多能转录因子可发挥协同作用, 提高去分化的效率。

利用小分子化学物质或生长因子与转录因子结合诱导体细胞重编程, 是一种较为安全的诱导方法^[21]。Huangfu 等^[22]以反转录病毒携带 oct-4 和 sox-2 转染新生儿成纤维细胞系, 再将其用丙戊酸处理 1~2 周, 可将成纤维细胞诱导为多能干细胞, 而且成功率与 Nakagawa 等^[23]采用 oct-4、sox-2 和 klf-4 诱导成纤维细胞为 iPS 细胞相似。也就是, 丙戊酸处理可代替 klf-4 并增加安全性, 用小分子物质代替原癌基因, 为体细胞去分化提供了新思路。

3 多能转录因子在肿瘤发生中的作用

Oct-4 在多种体细胞来源和生殖细胞来源的肿瘤中均有表达, 如乳腺癌、结肠癌、精原细胞瘤等。在大鼠畸胎瘤中, Oct-4 过表达可加剧肿瘤的恶性程度^[24]。Chen 等^[25]发现在 CD133⁺肺癌细胞中高表达 Oct-4 的细胞系, 恶性程度较高, 耐药性强, 放化疗效果不佳。以反转录病毒携带的 oct-4 siRNA 阻断内源性的 Oct-4 表达, 肺癌细胞由 CD133⁺转变为 CD133⁻, 肿瘤的侵袭性和对放化疗的抵抗作用降低。由此推测, Oct-4 是调节肿瘤干细胞特性的重要因子。Hochedlinger 等^[26]

采用多西环素依赖的表达系统使大鼠体细胞中 Oct-4 异位过表达, 会引起胃、肠、皮肤等组织的发育异常, 病损区组织中分化细胞减少, 未成熟细胞增多。他们推测: Oct-4 通过促进上皮前体的增殖或诱导体细胞去分化, 使组织呈现幼稚状态导致发育异常。

4 多能转录因子在牙髓细胞中的表达

2000 年, Gronthos 等^[27]从成人的牙髓中分离到的具有自我更新和多向分化潜能的牙髓干细胞 (dental pulp stem cell, DPSC), 是最具潜力等的牙组织工程种子细胞之一。2008 年, Gandia 等^[28]将 DPSC 注入心肌梗死的大鼠体内后发现, DPSC 分泌前血管生成因子和抗程序性细胞死亡因子, 促进梗死区域的血管再生和组织修复。Huang 等^[29]在将猕猴 DPSC 移植到免疫抑制小鼠的海马回后发现, DPSC 促进神经前体细胞的增殖、迁移和归巢。以上研究, 为 DPSC 应用于全身性疾病的治疗开辟了新的思路。

2006 年, Kerkis 等^[30]从脱落的乳牙中分离到表达 Oct-4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4 等 ESC 标志的 DPSC。Cheng 等^[31]亦报道: 成年猩猩的牙髓组织中含有 Oct-4、Sox-2、Nanog 和 Rex-1 阳性细胞。Greco 等^[32]证实: Oct-4 对骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMMSC) 的调节作用与 ESC 类似, 与 Nanog 和 Sox-2 协同维持 BMMSC 的未分化状态。当 Oct-4 的表达受抑制, 其分化相关基因 p63 表达上调, 维持干性的相关基因表达下调; 当敲除 oct-4 基因后, BMMSC 的细胞周期相关基因表达下调, 细胞周期抑制因子 p21 表达上调, 细胞发生分化。由于 DPSC 与 BMMSC 的基因谱、表面抗原和分化性能相似^[33], 因而推测 Oct-4 对 DPSC 干性的调节作用可能与 BMMSC 类似, 转染 oct-4 的 DPSC 有望通过干性的改良成为更具优势的种子细胞。

5 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] Herr W, Cleary MA. The POU domain: Versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(14): 1679-1693.
- [3] Girard F, Crémazy F, Berta P, et al. Expression pattern of the Sox31 gene during zebrafish embryonic development[J]. *Mech Dev*, 2001, 100(1): 71-73.
- [4] Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation[J]. *Cell*, 2005, 123(5): 917-929.
- [5] Pesce M, Schöler HR. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development[J]. *Stem Cells*, 2001, 19(4): 271-278.
- [6] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells[J]. *Nat Genet*, 2000, 24(4): 372-376.
- [7] Hannan NR, Wolvetang EJ. Adipocyte differentiation in human embryonic stem cells transduced with Oct4 shRNA lentivirus[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(4): 653-660.
- [8] Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal[J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(4): 403-415.
- [9] Pain D, Chirn GW, Strassel C, et al. Multiple retrosequences from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 6265-6268.
- [10] Zangrossi S, Marabese M, Broggin M, et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1675-1680.
- [11] Aoi T, 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.
- [12] Stadtfeld M, Brenman K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells[J]. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890-894.
- [13] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 141-146.
- [14] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151-159.
- [15] Ellis P, Fagan BM, Magness ST, et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult[J]. *Dev Neurosci*, 2004, 26(2/3/4): 148-165.
- [16] Eminli S, Utikal J, Arnold K, et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(10): 2467-2474.
- [17] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors[J]. *Nature*, 2008, 454(7204): 646-650.
- [18] Grinnell KL, Yang B, Eckert RL, et al. De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(2): 372-380.

- [19] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells[J]. Cell, 2009, 136(3):411-419.
- [20] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2007, 448(7151):313-317.
- [21] 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.
- [22] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(11):1269-1275.
- [23] 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.
- [24] Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, et al. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant[J]. Cancer Cell, 2003, 4(5):361-370.
- [25] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells[J]. PLoS One, 2008, 3(7):e2637.
- [26] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. Cell, 2005, 121(3):465-477.
- [27] Gronthos S, Mankani M, Brahim J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells(DPSCs) *in vitro* and *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25):13625-13630.
- [28] Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction[J]. Stem Cells, 2008, 26(3):638-645.
- [29] Huang AH, Snyder BR, Cheng PH, et al. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice[J]. Stem Cells, 2008, 26(10):2654-2663.
- [30] Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers[J]. Cells Tissues Organs, 2006, 184(3/4):105-116.
- [31] Cheng PH, Snyder B, Fillos D, et al. Postnatal stem/progenitor cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee[J]. BMC Cell Biol, 2008, 9:20.
- [32] Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2007, 25(12):3143-3154.
- [33] Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis[J]. Bone, 2001, 29(6):532-539.

(本文编辑 汤亚玲)

2011年第4次中国口腔颌面修复重建外科学术会议征文及会议通知

中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会修复重建协作组将于2011年8月中下旬在烟台召开第4次中国口腔颌面修复重建外科学术会议。届时将邀请国际知名专家和国内相关学科(神经外科、骨科及眼科)专家讨论有关口腔颌面畸形的治疗及基础研究、颌面部整形美容技术、颌颌面种植外科及磨复修补、微创外科技术在颌颌面外科的应用、数字化医学、再生医学等热点问题。

现征集各类学术论文摘要。来稿形式：结构式论文摘要、病例报告摘要、其他类论文摘要(800字以内)。来稿受理：汤炜，E-mail: mydrtw@vip.sina.com; 王升志，E-mail: wangsz916@163.com。投稿截止日期：2011年8月上旬。

会议报名：书面回执请于2011年8月初之前寄出。寄至：山东省烟台市毓璜顶东路20号毓璜顶医院王升志收；邮政编码：264000。网上报名请将回执于2011年8月初之前发回。网上报名E-mail: wangsz916@163.com。会议费：1000元/人，包括会议资料和会务费。食宿安排：会议统一安排食宿，费用自理。

中华口腔医学会口腔颌面外科专业委员会修复重建协作组
山东烟台毓璜顶医院