

· 综述 ·

诱导多潜能干细胞的研究进展

宋捷, 缪朝玉 (第二军医大学药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 诱导多潜能干细胞(IPSC)自2006年问世,就备受全球各大实验室广泛关注,成为生命科学领域新的里程碑。本篇综述旨在回顾多潜能性的研究历史,重点介绍IPSC培养技术,探讨IPSC培养技术在细胞治疗方面的应用前景。通过大量查阅国内外相关领域的综述及论著,本文归纳总结近年来IPSC领域的最新研究成果,以期为该领域后续的探索性研究提供参考。

[关键词] 多潜能性细胞;IPSC培养技术;细胞治疗

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0001-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.001

Progress on induced pluripotent stem cell

SONG Jie, MIAO Chao-yu (Department of Pharmacology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] The IPSC technology, which was discovered in 2006, had drawn much attention among laboratories around the world and become a new milestone in the life science. The history of pluripotency study, with an emphasis on the culturing technology of IPSC and its potential applications in cell therapy was reviewed. According to the large amount of reviews and articles, the progress that had been made in the IPSC field in recent years in hope to provide some references for the subsequent research.

[Key words] pluripotent cell; IPSC culturing technology; cell therapy

诱导多潜能性干细胞(induced pluripotent stem cells, IPSC)是指通过在分化的体细胞中表达特定的转录因子,以诱导体细胞的重编程而获得的可不断自我更新且具有多向分化潜能的细胞。2006年,日本科学家Takahashi和Yamanaka在对多潜能相关转录因子筛选体系的研究过程中发现,向胎鼠成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)中导入Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4这4个转录因子,可诱导成纤维细胞产生形态学与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)相似的细胞克隆,即IPSC。这些得到的IPSC经进一步实验证实,符合部分多潜能细胞的鉴定标准^[1]。这一重大发现激起了人们对IPSC研究的极大热情,对IPSC的研究和关注度呈爆炸式增长。作为多潜能性研究的新兴手段,IPSC培养技术克服了传统研究手段的两大瓶颈:免疫排斥和伦理限制。近年来,随着该领域理论研究的不断深入,研究手段的日益更新,IPSC培养技术取得的巨大进展在生命科学、医药等多个领域极具应用价值。本文主要回顾了多潜能性的研究历程,对近年IPSC培

养技术研究进展进行综述。

1 多潜能性研究历史回顾

1.1 核移植及动物克隆技术 20世纪50年代,Briggs and King建立了体细胞核移植技术,亦称克隆技术,证实分离出的细胞核具有分化潜能^[2]。此后,各种不同细胞来源的克隆动物相继问世,进一步表明分化细胞仍然保持遗传学上的全能性。然而克隆效率极低,且大多数克隆动物及后代在随后发育的各个阶段或多或少都会出现表型和基因表达异常。这些现象提示人们,体细胞核移植的重编程过程并不十分理想。

1.2 多潜能细胞系的建立及融合杂交技术 向IPSC培养技术迈进的另一重大突破是多潜能细胞系的建立。多潜能细胞系主要包括畸胎瘤来源的胚胎瘤性细胞(embryonal carcinoma cells, ECC)和囊胚内细胞团分离得到的ESC。ECC产生于生殖系的肿瘤细胞,可无限传代,在培养基的扩大培养过程中仍能够保持多潜能的特性。ECC与体细胞融合产生的杂交瘤细胞不仅保留了ECC的生化特性和分化潜能,同时还获得了融合体细胞的相应特性^[3]。ESC是目前研究最成熟的多潜能干细胞。它们通常由囊胚内细胞团分离得到,可在适当条件下在体外建系。ESC的多潜能性使其可分化成动物及人体内200多

[基金项目] 国家973计划课题(2009CB521902); 国家科技重大专项“重大新药创制”(2009ZX09303-002)。

[作者简介] 宋捷(1987-),女,硕士研究生。E-mail: jenny.song@yahoo.cn.

[通讯作者] 缪朝玉。E-mail: cymiao@smmu.edu.cn.

种细胞类型,并且能够发育成所有类型的成体组织包括生殖系,经四倍体囊胚注射后甚至具有能够发育成完整生物个体的能力。通过对多潜能细胞系的研究,人们意识到这些细胞中确实存在能够诱导细胞进行重编程的遗传信息。

1.3 转录因子和细胞系的转换 细胞系相关转录因子的发现亦极大地推动了多潜能性的研究。细胞系相关转录因子通过诱导特定细胞系相关的基因表达,抑制无关基因表达从而稳定维持特定类型细胞系细胞的特性。在异源细胞系中外源性表达特定细胞系相关转录因子能够转变异源细胞的命运。利用该原理,目前已实现多种细胞系之间的转换,包括淋巴细胞向巨噬细胞的转换^[4],成纤维细胞向骨骼肌细胞^[5]、心肌细胞^[6]的转换等。这些实验结果证实,细胞系之间的转换并非严格受限于相似的细胞系或胚层。一些早期的转分化实验为后期系统地研究转录因子介导分化细胞的重编程过程提供了清晰的思路和实验框架。

1.4 IPSC 的建立 为了进一步验证筛选能将成体细胞重编程为多潜能细胞的转录因子,Yamanaka 和 Takahashi 设计了一个包含 24 个与细胞多潜能性相关候选基因的筛选体系。经过筛选,组合最终获得一组最核心的转录因子 Klf4, Sox2, c-Myc, Oct4,它们在诱导细胞产生多潜能性过程中起到关键性作用。通过 Fbxo15 位点的激活筛选得到的 IPSC 能够表达多潜能性干细胞特异性表达的标志性分子 SSEA-1 和 Nanog;在免疫缺陷小鼠体内可产生畸胎瘤;经囊胚注射亦可使胚胎分化发育成各种组织。但这些 IPSC 无生殖系转移能力且不能培育出成活的嵌合体小鼠^[1]。

继这项研究之后,全球多个实验室在该研究基础上取得了进一步的改进和完善,使得到的 IPSC 在分子水平和生化功能方面更接近于 ESC。目前,IPSC 已从人类、大鼠、恒河猴等多个物种中分离得到。多种类型的体细胞群亦可被诱导分化为 IPSC,包括角蛋白细胞^[7]、神经细胞^[8]、黑色素细胞^[9]、胰岛 β 细胞^[10]、脂肪细胞^[11]以及终末分化的淋巴细胞^[12]。此外,全部由 IPSC 发育而来的纯合子小鼠也已得到^[13]。诱导多潜能性过程中的共同特征正在进一步研究中。

2 IPSC 培养技术研究进展

由于来源及伦理上不受限制,具有很强的可操作性,IPSC 培养技术在近十年来被不断地改进完善,并开始逐渐应用于临床。IPSC 培养技术主要涉及如下步骤:①宿主细胞的分离培养;②重编程转录因子

导入宿主细胞;③重编程细胞的培养及转化;④多潜能阳性克隆的识别鉴定。其中,对重编程因子转导过程的研究一直是 IPSC 培养技术的研究热点。因为重编程因子转导效率是体细胞重编程过程中最核心、最关键的环节。能否高效、安全地将转录因子导入供体细胞几乎决定了整个重编程过程的成败。

最初,Yamanaka 小组使用具有结构活性的逆转录病毒载体,将 c-Myc, Klf4, Oct4, Sox2 稳定整合入宿主细胞基因组中^[1]。但由于重编程过程中会出现 DNA 和组蛋白甲基转移酶的激活,多潜能相关基因在体细胞去分化后期会出现表达沉默。因此,这种逆转录病毒介导的重编程过程通常是不完全的。此外,病毒携带的基因片段若在重编程后细胞的分化发育过程中被重新激活,则会阻断细胞分化,形成肿瘤^[14]。随后发展的诱导型慢病毒载体可以消除转入基因的持续性表达,并可形成多顺反子的转录结构,在一定程度上提高了重编程的效率及安全性。

整合入宿主细胞的外源基因若异常过量表达,或者引起宿主基因组的插入突变都是构成细胞损害的潜在因素。为了避免上述现象的出现,非整合型 IPSC 应运而生。非整合型 IPSC 培养时使用的载体主要包括非整合型载体、可移除的整合型载体和非核酸类载体。

腺病毒是经典的非整合型载体。转录因子基因由腺病毒介导在宿主细胞中瞬时表达,诱导细胞产生多潜能性,获得无病毒整合的 IPSC。目前,第一代非整合型 IPSC 已利用非整合型腺病毒载体从成年小鼠的肝细胞获得^[15]。由逆转录病毒介导的整合位点缺陷型 IPSC 的产生也同样证实,转录因子的瞬时表达即可诱导重编程过程^[16]。此外,人类成纤维细胞来源的 IPSC 细胞克隆亦可通过除腺病毒外的其他非整合型载体获得得到,包括仙台病毒^[17],可自我复制的选择性游离基因^[18]以及微小环状多顺反子载体^[19]。

目前非整合型途径所介导的重编程效率比整合型载体介导的重编程效率低几个数量级,这极有可能是因为转录因子的表达不能够维持足够长时间以至于细胞的表型重塑过程未能进行完全。为了解决这个问题,多个实验室已经研究出能进行非依赖性整合的基因转移载体。piggyBac 转位子是一类可移动的基因元件,它可在转移酶的瞬时表达作用下插入或者脱离宿主基因组^[20]。该过程的出错率较低,能够介导较完全的基因切除,但是转位子移除前后都需要 IPSC 中存在特征性的整合位点。此外,转移酶的表达是否会引起 IPSC 中非特异性基因表达的改变依然有待进一步的研究。

近年来,非核酸类载体重编程过程也取得了一定发展。纯化的重编程转录因子重组蛋白已能成功地将小鼠和人的成纤维细胞培养成 iPSC^[21]。从 ESC 分离出的全细胞抽提物亦可实现上述细胞的去分化过程^[22]。虽然纯化的转录因子重组蛋白所介导的重编程不涉及基因转移过程,是一种具有发展前景的方法,但它的重编程效率非常低,并且通常需要在培养体系中加入组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA。此外,人们开始筛选小分子化合物用于提高重编程效率。一些小分子化合物的组合甚至能够完全替代重编程转录因子,这让完全使用化合物培育 iPSC 的设想成为可能^[23]。

3 IPSC 应用研究进展

自 IPSC 培养技术问世以来,全球各实验室对该领域的研究热情只增不减,对该技术机制的研究日渐深入,对该技术方法的改进日趋完善。随着 IPSC 培养技术逐步成熟完善,它将作为一种有力的研究工具,更广泛地被运用于发育生物学、细胞治疗、疾病模型等多个领域。

3.1 疾病模型的建立及药物发展 通常人类疾病模型的建立是基于对 ESC 的遗传改造。与之相比,利用 IPSC 重建疾病模型的过程则相对简单,且仿真度也较高。对 I 型糖尿病、阿尔茨海默病等多种退行性疾病而言,由于病变组织样本获取困难,且较长时间在体外条件下培养,这类疾病的研究进展一直比较缓慢。将该类病人来源的 iPSC 在体外定向分化,可大量获得疾病相关的特定类型细胞。这些 iPSC 很可能会按照体内疾病发生的过程定向分化,为研究人员很好地复制出疾病发生发展模型,便于人们了解疾病早期的病理变化过程,揭示发病机制,从根本上寻找治疗途径。

目前,一些实验室已从多种疾病患者体内分离得到了 iPSC,并建立起相应的疾病模型,包括亨廷顿舞蹈病,帕金森综合症,肌萎缩性侧索硬化症等^[24]。亦有研究团队证实^[25-27],病人细胞来源的 iPSC 在体外分化过程中出现的细胞异常变化,确实类似于病人体内的病理变化过程。当试验治疗药物作用于体外分化细胞时,相应的病理症状在一定程度上能够得到缓解。此外,药物治疗过程中的药效及毒副作用在不同个体间存在着很大的差异,它是阻碍新药发展的主要瓶颈之一。利用 IPSC 培养技术,人们可以培育出人群中代表各种不同表型的细胞系,高通量地筛选出具有针对性的新型药物,更准确地评估药物的治疗效果及毒副作用。很显然,IPSC 疾病模型的建立对疾病机制的研究及药物的发

展起到了不可估量的作用。

3.2 细胞治疗 最早将 iPSC 应用于细胞治疗是在镰刀型贫血动物模型上进行的。治疗过程首先将模型小鼠分离得到的表皮细胞在体外条件下重编程为 iPSC,再通过基因打靶的方式,对 iPSC 中引起疾病的突变位点进行修复。这些修复后的细胞随后又在体外被诱导成造血前体细胞,移植回输至贫血小鼠体内形成正常的红细胞,达到治愈疾病的目的^[28]。

目前,这种治疗手段已在多种人类疾病的动物模型上展开,包括帕金森综合症^[29], A 型血友病^[30],心脏病^[31]等。此外,病人细胞来源的细胞治疗也在探索中进行。Raya 及其团队使用慢病毒载体替代范可尼贫血病人细胞中的突变基因,使修复后重编程的细胞在体外维持正常细胞表型^[32]。

4 展望

虽然 IPSC 培养技术在动物模型上已取得一定进展,但它距离真正进入临床用于人体治疗还为时尚早。其主要障碍出于对人体安全性的考虑。IPSC 容易形成畸胎瘤,对于部分未完全分化的 iPSC 在植入人体后造成的不良影响尚没有被解决。此外,病毒介导产生的 iPSC 中可能残留的载体片段,在随 iPSC 移植到受体细胞后亦有可能对后者造成损害。尽管如此,iPSC 仍然被誉为生命科学领域的新的里程碑。目前,已有 ESC 治疗被批准应用于临床安全测试^[33]。相信随着研究技术的不断发展,多潜能细胞在临床应用中的探索和尝试会越来越受到重视。

【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.
- [2] Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs[J]. Proc Natl Acad Sci, 1952, 38(5): 455.
- [3] Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids[J]. Cell, 1976, 9(1): 45.
- [4] Xie H, Ye M, Feng R, et al. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages[J]. Cell, 2004, 117(5): 663.
- [5] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts[J]. Cell, 1987, 51(6): 987.
- [6] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors[J]. Cell, 2010, 142(3): 375.
- [7] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(11): 1276.

- [33] 唐文照, 庾石山. 少药八角果实及茎皮化学成分和药理活性研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [34] Tang WZ, Ma SG, Yu SS, *et al.* Rearranged prenylated C₆-C₃ compounds and a highly oxygenated seco-prezizaane-type sesquiterpene from the stem bark of *Illicium oligandrum* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(6):1017.
- [35] Wu XF, Li Y, Lu HN, *et al.* Prenylated C₆-C₃ compounds from the fruits of *Illicium simonsii* [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2009, 11(12):1056.
- [36] Chang JY, Abd Ei-Razek MH, Chen YH, *et al.* Phytoquinoids and secoprezizaane-type sesquiterpenes from *Illicium arborescens* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2010, 93(1):123.
- [37] Ma SG, Tang WZ, Liu YX, *et al.* Prenylated C₆-C₃ compounds with molecular diversity from the roots of *Illicium oligandrum* [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(1):115.
- [38] Itoigawa M, Ito C, Tokuda H, *et al.* Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoids and phytoquinoids from *Illicium plants* [J]. *Cancer Letters*, 2004, 214(2):165.
- [收稿日期]2011-10-11
[修回日期]2011-10-30

(上接第3页)

- [8] 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.
- [9] Utikal J, Maherali N, Kulalert W, *et al.* Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 19):3502.
- [10] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic β cells into induced pluripotent stem cells [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(12):890.
- [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 USA*, 2009, 106(37):15720.
- [12] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency [J]. *Cell*, 2008, 133(2):250.
- [13] Zhao XY, Li W, Lv Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation [J]. *Nature*, 2009, 461(7260):86.
- [14] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2007, 448(7151):313.
- [15] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration [J]. *Science*, 2008, 322(5903):945.
- [16] Varas F, Stadtfeld M, de Andres-Aguayo L, *et al.* Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(2):300.
- [17] Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, *et al.* Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome [J]. *Proc Jpn Acad*, 2009, 85(8):348.
- [18] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences [J]. *Science*, 2009, 324(5928):797.
- [19] Jia F, Wilson KD, Sun N, *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells [J]. *Nat Methods*, 2010, 7(3):197.
- [20] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2009, 458(7239):766.
- [21] Zhou H, Wu S, Joo JY, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(5):381.
- [22] Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation [J]. *Blood*, 2010, 116(3):386.
- [23] Desponts C, Ding S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 636:207.
- [24] Park IH, Arora N, Huo H, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2008, 134(5):877.
- [25] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient [J]. *Nature*, 2009, 457(7227):277.
- [26] 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.
- [27] Carvajal-Vergara X, Sevilla A, DSouza SL, *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome [J]. *Nature*, 2010, 465(7299):808.
- [28] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin [J]. *Science*, 2007, 318(5858):1920.
- [29] M. Wernig, J. Pruszak, E. Hedlund, *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*, 2008, 105(15):5856.
- [30] D. Xu, LM. Fink, DM. Adcock, *et al.* Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2009, 106(3):808.
- [31] T. J. Nelson, S. Yamada, C. Perez-Terzic, *et al.* Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells [J]. *Circ*, 2009, 120(5):408.
- [32] Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells [J]. *Nature*, 2009, 460(7251):53.
- [33] Couzin J. Celebration and concern over U. S. trial of embryonic stem cells [J]. *Science*, 2009, 323(5914):568.
- [收稿日期]2011-05-06
[修回日期]2011-06-08