

*专题评述 *

诱导性多能干细胞研究及应用 *

习佳飞 李艳华 裴雪涛 **

军事医学科学院输血医学研究所干细胞与再生医学研究室, 北京 100850

摘要 诱导性多能干细胞(iPS 细胞)是通过向体细胞中导入 *Oct4*, *Sox2*, *c-myc* 和 *Klf4* 等基因, 使体细胞重编程获得具有胚胎干细胞样特性的多能干细胞。iPS 细胞的产生可谓干细胞领域的新里程碑。近两年, iPS 细胞的研究突飞猛进, 文中结合最新的研究成果, 综述了 iPS 细胞的研究现状、进展, 如新的 iPS 细胞诱导方法的建立、诱导 iPS 细胞产生效率的提高、iPS 细胞的定向诱导分化及其在疾病模型治疗中的作用等。针对 iPS 细胞研究领域存在的问题, 包括如何提高 iPS 细胞生成的效率、解决其临床应用的安全性、iPS 细胞重编程的机制等进行了讨论, 为今后进一步开展 iPS 细胞的研究提供了帮助。

关键词 诱导性多能干细胞 细胞治疗 重编程

胚胎干细胞(ES 细胞)由于具有发育上的全能性而备受研究者重视, 但其获取的困难、免疫排斥的风险和伦理学的争议等也使其研究和应用饱受困扰。因此, 人们一直试图找到一种方法, 将人体正常体细胞直接重编程为 ES 样细胞。2006 年, 日本京都大学的 Yamanaka 研究小组发现^[1], 把 4 种与维持 ES 细胞全能性相关的基因(*Oct4*, *Sox2*, *c-myc* 和 *Klf4*)通过逆转录病毒载体转入小鼠的成纤维细胞, 可以把成纤维细胞变成在性能和多向分化能力上类似于 ES 细胞的多能干细胞, 并将其命名为“诱导性多能干细胞”(iPS 细胞)。iPS 细胞不论是在形态、增殖分化能力、细胞表面抗原、基因表达模式等方面, 均与 ES 细胞有着极大的相似性, 而且, iPS 细胞在体内外均能向三个胚层的细胞类型分化。随后, 2007 年底日本 Yamanaka 和美国 Thomson 实验室分别在 *Cell*^[2] 和 *Science*^[3] 杂志上发表论文, 报道他们利用人类皮肤成纤维细胞培育出了人类 iPS 细胞, 后者所用的基因(*Oct4*, *Sox2*,

Nanog 和 *Lin28*)与前者(*Oct4*, *Sox2*, *c-myc* 和 *Klf4*)有两个不同。随后美国的另一个研究小组也发表了建立人 iPS 细胞的研究成果, 并尝试利用多种细胞来诱导生成 iPS 细胞, 其中包括成人来源的间充质干细胞^[4]。

iPS 细胞问世仅一两年的时间, 其研究成果和技术突破便层出不穷, 包括新的 iPS 细胞诱导方法的建立、诱导 iPS 细胞产生效率的提高、iPS 细胞产生及细胞重编程机制的研究、iPS 细胞的定向诱导分化及其在疾病模型治疗中的作用等。

1 诱导不同起始细胞获得 iPS 细胞

为了验证 iPS 细胞的产生是否具有广泛性, 研究者在胚胎成纤维细胞的基础上开始尝试利用各种不同组织细胞来诱导 iPS 细胞生成。利用 DOX 系统诱导重编程基因修饰过的小鼠 B 淋巴细胞表达外源性的 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*, 可以使其重编程为 iPS 细胞, 首次证明了终末分化的造血细胞同

2009-01-08 收稿, 2009-04-14 收修改稿

* 国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA02A107)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2009CB941100)资助项目

** 通信作者, E-mail: peixt@nic.bmi.ac.cn

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

样能够利用iPS技术实现重编程^[5]。随后利用同样的方法将小鼠肝脏细胞^[6]、胃上皮细胞、胰岛β细胞^[7]等细胞重编程为iPS细胞，扩大了iPS细胞建立的细胞来源。同时由人皮肤组织中的角化细胞诱导获得iPS细胞使得获得供体细胞更加方便，并且其重编程效率比利用成纤维细胞提高100倍，诱导时间可以缩短一半^[8]，其重编程效率的提高可能与角化干细胞的存在有关。另有研究仅用两个转录因子即实现了小鼠神经干细胞重编程为iPS细胞，原因除了神经干细胞内源性高表达 Sox2 和 c-Myc，所以仅仅导入 Oct4 和 Klf4 就足以使其重编程^[9]。

除了小鼠和人iPS细胞的建立，研究者用iPS技术成功建立灵长类^[10]及大鼠^[11]的iPS细胞，为进一步研究其他物种的重编程机制提供很好的模型。

这些研究进一步证明了iPS细胞技术的普遍适用性，使得获得iPS细胞的来源更加广泛，可以开展针对性的研究。今后还可以比较不同起始细胞来源的iPS细胞之间的区别，有助于更深入地了解iPS细胞产生的机制和拓展今后的应用领域。

2 优化iPS细胞产生条件

尽管iPS细胞自问世以来受到了极大的关注，但仍有两个最紧迫的问题需要解决。首先就是安全性问题，因为建立过程中导入了致瘤基因，使得iPS细胞具有致瘤风险，不适合应用在临床细胞治疗中；另一个备受关注的问题就是iPS细胞生成效率非常低，这也限制了其今后可能的应用，因此研究者尝试了利用各种方法来改进和提高诱导效率。

最早的iPS细胞的建系采用Fbxl5作为筛选标志进行筛选，这种早期产生的iPS细胞也被称为Fbxl5-iPS细胞，它虽然具有和ES细胞同样的形态和增殖能力以及形成体内畸胎瘤的能力，但是不能形成嵌合体小鼠。随后改用Nanog作为筛选标志，建立的iPS细胞与Fbxl5-iPS细胞相比在基因表达模式和DNA甲基化模式上与ES细胞更接近，而且在嵌合体小鼠中能够参与生殖系细胞的遗传，但是有20%的后代由于c-myc表达的重新激活而发生肿瘤，因此在iPS细胞的产生中应该避免使用肿瘤相关基因^[12]。

目前，人们常用的建立iPS细胞的方法是利用

逆转录病毒载体导入重编程因子。由于所用的病毒载体能随机永久整合到基因组内，可能引起基因突变，这就为iPS细胞应用于临床治疗带来风险。为解决这一问题，需要尝试开发不同诱导方法来提高iPS细胞产生的安全性。研究者将4个转录因子(Oct4, Sox2, c-myc和Klf4)构建到一个病毒载体中，并成功利用该载体诱导小鼠和人体细胞形成iPS细胞，单个病毒载体有助于减少载体整合引起基因突变的几率^[13]。利用瞬时表达的腺病毒载体转染4个基因同样能够实现诱导成纤维细胞和小鼠肝细胞获得iPS细胞，而且腺病毒载体并不整合到细胞基因组内，这就解决了iPS细胞建系中最大的安全问题^[14]。更进一步的研究表明诱导iPS细胞生成可以不应用任何病毒载体，仅用两个表达质粒就可实现诱导小鼠胚胎成纤维细胞形成iPS细胞，其中一个质粒携带Oct4, Sox2 和 Klf4 的cDNA序列，另一个质粒携带c-Myc的cDNA序列，该方法对解决iPS细胞应用中的安全性问题具有十分重要的意义^[15]。另有报道，直接转染蛋白质分子可实现体细胞重编程，甚至可以只在培养体系中添加诱导因子来实现iPS细胞的建立，提高重编程的效率^[16]。

在优化iPS细胞生成的方法、减少致瘤相关基因及提高诱导效率的研究中，小分子化合物成为另一个研究热点。联合利用两个小分子化合物和Oct4及Klf4两个转录因子可以成功诱导小鼠胚胎成纤维细胞形成iPS细胞，所用小分子化合物分别为BIX-01294(G9a组蛋白甲基转移酶抑制剂)和Bay K8644(一种钙激动剂)^[17]。另外DNA甲基转移酶抑制剂和组蛋白脱乙酰化酶抑制剂亦可提高重编程效率，尤其是丙戊酸(一种组蛋白脱乙酰化酶抑制剂)可以提高重编程效率超过100倍^[18]。更进一步的研究表明在添加VPA的Oct4, Sox2两因子诱导体系中，重编程也可以进行，说明小分子化合物不仅可以提高诱导重编程的效率，同时可以替代某个诱导因子来进行重编程^[19]。

小分子化合物在诱导iPS生成过程中具有确定的作用，还具有更大的开发前景，仅利用小分子化合物就能实现iPS的重编程是今后研究人员努力的方向。

3 iPS 细胞重编程机制研究

重编程机制的研究对 iPS 细胞的制备、制备效率的提高、安全性评估、定向诱导分化、疾病分子机制研究、以及今后的临床应用等均具有重要意义。虽然目前我们对体细胞诱导重编程的机制还知之甚少，但是最近在 ES 细胞等干细胞中对基因组水平和表观遗传学水平开展的大规模的研究将对了解整个重编程机制有重要的提示作用，并最终产生积极的影响。

研究 iPS 细胞产生的机制需要合适的模型。目前建立的一个比较成功的模型就是利用四环素诱导的慢病毒载体诱导胚胎成纤维细胞生成 iPS 细胞，并利用其进行相关机制研究。研究发现，外源的转录因子的表达约需 10 d，然后细胞就可以进入自我维持的多能性状态。在重编程完成前一些标志性的分子的表达情况是，在最早期是 Thy1 表达的下调和 SSEA-1 的上调，在重编程的后期才有内源性的 Oct4，Sox2 表达。端粒酶活性提高和 X 染色体沉默可以作为重编程的末期事件。利用这些标记物进行分选可以明显地富集 iPS 细胞的前体细胞。由转录因子诱导的重编程过程是一个渐进的过程，其具有一个确定的中间过渡期，其中含有可以重编程成功的过渡细胞，确定这一中间细胞的特性对于研究整个重编程的机制具有重要的作用^[20]。另一项研究利用相似的研究策略，确定了重编程过程中的一些分子事件，与前一研究略有不同的是，其研究的结果表明碱性磷酸酶的表达是最早期的事件，随后 SSEA-1 得到表达，表达 Nanog 和内源性的 Oct4 则是重编程的末期事件，可以作为重编程成功的标志，而且研究还表明细胞外源性基因的沉默是重编程所必需的，外源性的基因至少需要表达 12 d 才能完成重编程过程^[21]。

表观遗传学的改变在干细胞分化和重编程过程中具有重要的作用。虽然我们对此还知之甚少，近期随着大规模测序技术的发展，使得在全基因组范围内研究表观遗传学的变化成为可能。最近一项研究即通过基因组学分析方法对重编程的机制进行了研究，结果提示重编程效率低主要由于两方面的原因，一是对分化相关的转录因子抑制不完全，二是 DNA 的去甲基化不完全，该研究小组分别对特定

转录因子进行 knockdown 和使用 DNA 甲基转移酶抑制剂均显示可以提高重编程的效率^[22]。

在 iPS 细胞产生过程中表观遗传学的状态对于研究其机制及最终的临床应用均具有重要的影响。对于来源于雌性供体细胞的 iPS 细胞在重编程过程中表现出 X 染色体的重新激活，但是在其分化时可以出现 X 染色体随机失活，同时分析两个关键的组蛋白修饰状态表明 iPS 细胞与 ES 细胞高度一致，证明转录因子诱导的多能细胞可以实现表观遗传学的完全逆转，因此表观遗传学的重编程的异常不应成为影响 iPS 今后临床治疗应用的问题^[23]。

总之，对于仅仅“转染”少数的转录因子就能实现体细胞重编程为 iPS 细胞的机制我们还了解的非常少，需要进行大量细致的研究，而在整个过程中基因改变和表观遗传学的改变是确定的研究方向，而在 ES 细胞中进行的研究肯定能给我们很多提示。

4 iPS 细胞的应用

iPS 细胞的出现为整个干细胞生物学和再生医学领域带来了革命性的影响，伴随着的与 iPS 应用相关的研究也迅速开展。如将其向造血细胞诱导分化，治疗小鼠的镰刀状细胞性贫血^[24]；将小鼠 iPS 细胞诱导分化为神经元和神经胶质细胞，整合入小鼠大脑组织内发挥功能；将小鼠 iPS 细胞在体外分化为多巴胺能神经元，移植入帕金森氏病模型的大鼠脑内以改善疾病症状等^[25]。这些都证明以 iPS 细胞为基础的细胞治疗在动物体内可以实现。iPS 细胞技术的建立已经取得了鼓舞人心的突破。哈佛大学的研究人员成功地将一个患家族性脊髓侧索硬化症 (ALS) 的 82 岁女性患者的成纤维细胞重编程为 iPS 细胞，并且诱导 iPS 细胞成为有一定缺陷的运动神经元。该模型的建立可以用来研究该疾病的发病机制，筛选可能的治疗药物，并有可能最终应用于自体细胞移植治疗 ALS^[26]。从患脊髓性肌萎缩的儿童患者皮肤成纤维细胞也已成功获得 iPS 细胞，其能够在体外增殖，并且能够保持疾病的基因表型，体外诱导分化能够形成运动神经元^[27]。此外更多种类的人类疾病 iPS 细胞系已经成功建立^[28]，这些细胞系的建立为研究相关疾病的发生机制和相关药物开发提供了十分珍贵的模型。

5 小结

iPS 细胞的建立及其相关研究进展令人兴奋, 2008 年被 *Science* 杂志评为十大科学突破之首^[29], 相关机制和应用研究为我们展示了干细胞与再生医学的一个全新领域。iPS 细胞制备技术使得在不使用胚胎或卵母细胞的前提下制备用于疾病研究或治疗的胚胎干细胞成为可能, 这一新的突破在理论上首次证实了人类已分化成熟的体细胞同样可以被重编程为类胚胎干细胞, 在技术上成功地避开了长期以来争论不休的伦理问题, 突破了核移植技术缺乏卵母细胞的窘境, 并为获得患者自身遗传背景的胚胎干细胞提供了一个新途径, 避免了干细胞移植所面临的免疫排斥问题, 从而为干细胞和再生医学的研究与应用开辟了一个全新的领域, 成为干细胞研究新的里程碑, 并将极大地推动该领域和相关科学领域的发展。

但 iPS 技术真正用于疾病的细胞治疗还有相当长的路要走, 还有一系列的科学和技术问题有待深入系统的研究, 如成熟体细胞转化为 iPS 细胞的效率还很低, 重编程的分子机制还不清楚, 所用的病毒载体随机整合到细胞的基因组中依然具有诱发细胞恶性转变的风险, 而瞬时转染重编程因子生成 iPS 细胞效率低等。但 iPS 细胞所提供的新思路、新技术和新方法具有重大的理论意义和实用价值, 将为干细胞和再生医学的应用提供治疗用的种子细胞; 同时, 也是研究发育生物学、疾病发生发展机制、基因与蛋白质功能分析、药物筛选与评价等的十分重要的工具。

参 考 文 献

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872
- 3 Yu JY, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917–1920
- 4 Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, 451(7175): 141–146
- 5 Hanna J, Markoulaki S, Scheroder P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133(2): 250–264
- 6 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 2008, 321(5889): 699–702
- 7 Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, 18(12): 890–894
- 8 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1276–1284
- 9 Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454(7204): 646–650
- 10 Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587–590
- 11 Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11–15
- 12 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448(7151): 313–317
- 13 Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, et al. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(1): 157–162
- 14 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322(5903): 945–949
- 15 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322(5903): 949–953
- 16 Marson A, Foreman R, Chevalier B, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2): 132–135
- 17 Shi Y, Desponts C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 568–574
- 18 Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795–797
- 19 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1269–1275
- 20 Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, et al. Defining molecule

- lar cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 230—240
- 21 Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151—159
- 22 Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49—55
- 23 Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55—70
- 24 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920—1923
- 25 Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(15): 5856—5861
- 26 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321(5893): 1218—1221
- 27 Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457(7227): 277—280
- 28 Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134(5): 877—886
- 29 Vogel G. Breakthrough of the year. *Reprogramming Cells*. *Science*, 2008, 322(5909): 1766—1767