

分化细胞经特定因子诱导重编程为多能干细胞

夏小雨, 褚建新, 陈学进

上海交通大学医学院附属新华医院 发育生物学重点实验室, 上海 200092

摘要: 胚胎干细胞在再生医学领域有着十分诱人的应用前景。但是现有胚胎干细胞建系技术不能避开对卵细胞的操作, 成为ES细胞临床应用的障碍。通过反转录病毒载体系统, 在小鼠和人类高度分化细胞中表达干细胞因子 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和/或 *c-Myc* 等基因, 再经过干细胞标志因子 *Nanog* 或 *Oct4* 筛选, 可以获得与ES细胞特性十分近似的诱导多能干细胞系。这种不依赖于卵细胞的多能干细胞建系方法无疑是干细胞实验技术的重大进展, 也是对现有重编程理论假设的突破。综述了诱导多能干细胞系建系实验结果, 并对诱导重编程的机制和诱导多能干细胞系的临床应用前景进行了讨论。

关键词: 多能干细胞, 干细胞因子, 诱导重编程, 诱导多能干细胞系, 反转录病毒转导系统

Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Reprogramming Differentiated Cells by Defined Factors

Xiaoyu Xia, Jianxin Chu, and Xuejin Chen

Key Laboratory of Developmental Biology, Xinhua Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Abstract: Embryonic stem cell is promising for regenerative medicine. However, its application is hampered by the utilization of eggs in most established methods. Recently, a new pluripotent stem cell establishing method was reported that, mouse and human differentiated cells could be induced reprogrammed into a pluripotent state by expressing exogenous stem factors such as *Oct4*, *Sox2*, *et al*, through retroviral transduction. This approach avoiding egg use is a great breakthrough not only in stem cell technology but also present theory hypothesis of reprogramming. Here these works were reviewed in this article. Both the mechanism of induced reprogramming and the prospects of induced pluripotent stem cells were discussed.

Keywords: pluripotent stem cell, stem cell factor, induced reprogramming, induced pluripotent stem cells (iPS), retroviral transduction system

众所周知, 干细胞在生物医学领域有着十分诱人的应用前景。干细胞分为胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES)和成体干细胞, 前者具有全面的分化潜能。但是, 现有的胚胎干细胞建系技术大都不能避开对卵母细胞/卵细胞的操作, 如核移植法、孤雌激活法等。卵母细胞材料不易取得, 影响了研究的开展。而这些技术如果应用于人类, 还面临着伦理

学的质疑。因此, 建立一种全新的、不需使用卵母细胞的胚胎干细胞的建系方法, 无疑具有重大意义。

虽然克隆动物不断出生, 干细胞领域研究成果频传, 但是, 对于其中最核心的理论问题——重编程的机制, 仍知之甚少。重编程的作用是使已分化细胞发生去分化/脱分化(De-differentiation), 回复到全能/多能性状态。现已证明, 将供体核移入未受精

Received: November 5, 2007; Accepted: January 17, 2008

Corresponding author: Xuejin Chen. Tel: +86-21-63846590-776539; E-mail: chenxuej@yahoo.com.cn

卵^[1]或1细胞期的受精卵^[2],或诱导分化细胞与干细胞融合^[3],都可以使分化细胞发生去分化。表明在受精前后的卵细胞或干细胞中存在一组关键物质,能完成去分化作用。据此,在分化细胞中表达这组特定因子,就有可能使分化细胞发生重编程而回复到多能状态。这一假设现已成为现实。2006年以来,国外有多个实验室通过在小鼠和人类高度分化细胞中表达外源性干细胞因子而诱导获得了与ES细胞特性十分近似的诱导多能干细胞(iPS细胞)系。本文综述了这批举世瞩目的前沿性研究成果,介绍了这一新的多能干细胞建系方法,并对这一方法的机理和应用前景加以讨论。

1 Oct4、Klf4、Sox2和Nanog等4因子诱导Fbx15筛选的小鼠iPS细胞系

ES细胞多能性的维持有两层含义:维持未分化状态和自我增殖;维持多分化潜能。虽然不同种属动物来源的ES细胞维持多能性的机制不完全相同,但对小鼠和人ES细胞来说,Oct4、Sox2、Nanog等同为最重要的一组干细胞因子。2006年,Yamanaka小组选择*Fbx15*^[4]作为报告基因,通过反转录病毒(Retrovirus)转导,研究各种基因产物在去分化过程中的作用^[5]。首先,该小组构建出稳定携带*Fbx15*^{βgeo/βgeo}基因的小鼠胚胎成纤维细胞系(MEFs)和小鼠尾端成纤维细胞系(TTFs)。在含高浓度G418的培养体系中,只有同时表达*Fbx15*和新霉素抗性的细胞克隆才能存活,可以认为此类表达*Fbx15*细胞克隆已部分回复了多能性。经过一系列实验,最终发现:在转导后第3天,以含高G418的ES培养基为筛选体系,则只有同时转导了*Oct4*、*Klf4*、*Sox2*和*c-Myc*基因的实验组,形成了具有ES细胞形态和增殖特性的克隆。

该小组将此类细胞命名为iPS细胞(Induced pluripotent stem cell);由Fbx15筛选出的克隆称为Fbx15 iPS。Fbx15 iPS细胞表达ES细胞标志物,如*Oct4*、*Nanog*、*E-Ras*、*Fgf4*等。将Fbx15 iPS细胞注射入裸鼠,可以形成包含3个分化胚层的畸胎瘤。

但是,Fbx15 iPS细胞并不具备ES细胞的全部特性。首先,在该细胞系中,内源性的*Oct4*、*Sox2*基因的表达几乎没有启动,其多能性的维持依赖于外源性诱导因子的持续表达。一些关键基因如*Oct4*的甲基化程度,显示出一种介于mES细胞和MEFs

细胞之间的过渡状态。其次,囊胚注射实验中未发现Fbx15 iPS细胞参与胚胎生殖系(Germ line)的形成;出生后的小鼠中不再能检测出Fbx15 iPS来源的细胞。说明Fbx15 iPS细胞并不具备ES细胞的全面分化潜能。

2 Oct4等4因子诱导的Nanog筛选的小鼠iPS细胞系

2.1 雄性Nanog iPS细胞系

Fbx15 iPS的性质可能受到筛选基因*Fbx15*的影响。在上述实验基础上,Yamanaka小组将绿色荧光蛋白(GFP)和嘌呤霉素抗性基因插入雄性小鼠MEFs细胞中*Nanog*基因的5'非编码区。再用反转录病毒载体在构建的MEFs中表达*Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*。在含嘌呤霉素的培养体系中筛选出了类ES克隆^[6]。将这一类克隆称为Nanog iPS细胞。

Nanog iPS细胞在形态学、增殖特性、干细胞标志物的表达与畸胎瘤形成方面都与mES细胞无显著差别(但不完全相同)。与Fbx15 iPS细胞不同,Nanog iPS细胞中外源*Oct4*等4基因的表达基本沉默^[7]。亚硫酸氢盐基因组测序分析(Bisulphite genomic sequencing analysis)实验证实,在Nanog iPS细胞的基因组上发生了广泛的去甲基化-再甲基化过程,建立起了类似ES细胞的甲基化模式。应该说,Nanog iPS细胞才是发生了真正意义上的重编程(Reprogramming)的iPS细胞。

因此,Nanog iPS细胞多能性的维持不再依赖于干细胞因子的外源性表达;而是通过内源性基因的启动和持续表达来维持。在长期传代培养中,Nanog iPS细胞多能性的维持比Fbx15 iPS细胞更加稳定。它对培养体系中添加的白血病抑制因子或维甲酸的反应也与mES细胞一致。将Nanog iPS细胞注射入雄性小鼠囊胚,在子代小鼠中,在包括睾丸在内的三胚层来源的多种器官中都可以检测出Nanog iPS来源的细胞。并在雄性嵌合体小鼠与正常雌性小鼠交配所得的F1和F2小鼠中得到了进一步证实。

2.2 雌性Nanog iPS细胞系

与Yamanaka小组同时,哈佛大学医学院Hochedlinger小组用类似方法也构建出了Oct4等4因子诱导、Nanog筛选的iPS细胞系^[35]。该小组将上述4种基因转入携带*Nanog-GFP*融合基因的雌

性小鼠 MEFs 细胞和 TTFs 细胞中表达, 得到的雌性 Nanog iPS 细胞系, 在形态学、增殖特性、分子生物学特性等方面都与 Yamanaka 小组的结果一致^[8]。

Hochedlinger 小组通过多种实验方法证实, 雌性 Nanog iPS 细胞系的表观遗传学特性与雌性 mES 细胞一致, 而与雄性 mES 细胞或小鼠分化细胞完全不同。首先, 甲基化敏感性的限制性内切酶 (Methylation-sensitive restriction enzyme) 实验表明, 在雌性 Nanog iPS 细胞中, 基因组的微卫星序列处于广泛的亚甲基化状态^[9]。其次, 原分化细胞中失活的 X 染色体在雌性 Nanog iPS 细胞中被激活。随后, 他们通过精巧的实验设计证明, 当雌性小鼠 TTFs 来源的 Nanog iPS 细胞分化形成类胚体 (Embryoid body) 时, 各细胞中两条 X 染色体发生随机失活。这些都与雌性 mES 的特性吻合^[10, 11], 证明内源性因子诱导的体细胞的重编程过程可以彻底消除原体细胞中的 X 染色体印迹, 并建立起新的 X 染色体随机失活模式, 在表观遗传学 (Epigenetics) 层次上证明了雌性 Nanog iPS 细胞发生了去分化。

Hochedlinger 小组还对 Nanog iPS 细胞系进行了一系列功能实验。在体外, Nanog iPS 细胞可被诱导表达造血细胞系和成熟血细胞表面标志物。将 Nanog iPS 细胞与 MEFs 细胞融合, 可诱导后者转变为类 ES 细胞克隆, 证明 Nanog iPS 细胞具有同 ES 细胞类似的重编程其他体细胞的能力。囊胚注射实验证实雌性 Nanog iPS 细胞可广泛参与三胚层的形成。在其中一只发育到成年的雌性嵌合体小鼠中采集了 16 个卵母细胞, 其中有 4 个可证明是雌性 Nanog iPS 细胞起源的。并且, 孤雌激活实验证明, 这两类 16 个不同起源的卵母细胞无明显功能差异。

3 Oct4 等 4 因子诱导的 Oct4 筛选的小鼠 iPS 细胞系

与此同时, 美国 Jaenisch 小组在小鼠 MEFs 和 TTFs 细胞的 *Oct4* 和 *Nanog2* 基因中分别插入编码新霉素抗性的序列, 再将 *Oct4* 等 4 基因转入构建的细胞系中表达。经新霉素筛选分别得到 Oct4 iPS 和 Nanog iPS 细胞系^[12]。

在这两类细胞系中, 外源基因被沉默。该小组进行了亚硫酸氢盐基因组测序分析实验、甲基化转移酶 Dnmt1 抑制实验和 2 倍体囊胚嵌合实验, 染色

质免疫沉淀实验和实时定量 PCR 实验, 畸胎瘤和胚胎嵌合体实验, 各自从不同角度证明了, Oct4 iPS 和 Nanog iPS 细胞在基因组甲基化动态、组蛋白修饰及生殖系形成方面具有与 mES 细胞一致的特性。

将 Oct4 iPS 和 Nanog iPS 细胞注射入 4 倍体囊胚中, 结果形成了全部由 Oct4 iPS 或 Nanog iPS 细胞发育而成的妊娠中晚期胚胎 (All iPS embryos), 这是检验细胞多能性的最严格的实验标准^[13], 充分证明了 iPS 细胞具有分化全能性。

4 Oct4, Sox2 和 Klf4 等 3 因子诱导的小鼠 iPS 细胞系

在 Yamanaka 小组的 Nanog iPS 细胞实验中, 约 20% 的 F1 子代患肿瘤, 并在肿瘤组织中检测到了外源 *c-Myc* 的表达, 可能为致癌因素。因此, 该小组随后尝试以不含 *c-Myc* 的诱导因子组合诱导小鼠 iPS 细胞系^[14]。当药物抗性筛选发生在 3 种外源基因转导后的第 14 天时, 确有 iPS 细胞克隆形成 (记作 *c-Myc*⁻ iPS 细胞)。当用形态学筛选取代药物抗性筛选时, 也得到了 *c-Myc*⁻ iPS 细胞克隆。*c-Myc*⁻ iPS 细胞克隆的基本生化特性与 mES 细胞及 4 因子诱导的 iPS 细胞一致。实验证明, Oct4, Sox2 和 Klf4 等 3 因子诱导 *c-Myc*⁻ iPS 细胞系的克隆形成率低而特异性很高。

以原有含 *c-Myc* 的 4 因子组合诱导得到的 iPS 细胞系为对照, 进行 *c-Myc*⁻ iPS 细胞囊胚注射实验, 所得到的嵌合体子代的百日死亡率分别为: *c-Myc*⁻ iPS 细胞组: 0%; 原 iPS 细胞组: 16.22% (均死于肿瘤)。证明不含 *c-Myc* 的 iPS 细胞诱导方式确实可以显著的降低 iPS 细胞诱发的肿瘤 (早期) 发生率。

5 人类 iPS 细胞的建系

5.1 Yamanaka 小组的工作

在之前工作的基础上, Yamanaka 小组将 *Oct4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 转入 3 种不同的人类成体细胞系, 经条件培养基培养 25 d 以上, 获得了类 ES 的人类 iPS 细胞克隆, 根据受体细胞的名称, 分别记为 human iPS (hDF)、human iPS (HFLS) 和 human iPS (BJ)^[15]。

实验证明, human iPS (hDF) 细胞系在形态学、增殖特性、培养基的选择、细胞表面标志物的表达、

端粒酶活性、组蛋白修饰等许多方面都表现出与人类 ES(hES)细胞一致的特性。而基因组甲基化模式和基因表达谱则与 h ES 细胞不完全相同。在体外, human iPS(hDF)细胞可经特异性诱导分化为神经细胞和有功能的心脏细胞,表达各自的分化特异性标志物。类胚体和畸胎瘤形成实验表明,该细胞系可分化形成三胚层。

随后,该小组用不含 *c-Myc* 的 3 因子组合诱导人类 iPS 细胞建系也获成功^[14]。

5.2 Yu 及其同事的工作

Yu J 等在未经基因修饰的人类胎儿成纤维细胞系 IMR90(IMR90 fetal fibroblasts)和人类新生儿包皮成纤维细胞系 (Human newborn foreskin fibroblasts)ATCC 中,通过慢病毒(Lentivirus)转导 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 和 *Lin-28* 基因,经形态学筛选,得到了类 ES 细胞的人类 iPS 细胞克隆,分别记为 human iPS(IMR90)和 human iPS(foreskin)^[16]。

在长期传代培养中,这两种人类 iPS 细胞系均稳定的表现出一系列 h ES 细胞的特性:形态典型;核型正常;细胞中存在端粒酶活性;表达 h ES 的表面标志物 SSEA-3、SSEA-4、Tra-1-60 和 Tra-1-81。类胚体和畸胎瘤形成实验表明,这两种人类 iPS 细胞系可分化形成三胚层。

但是,该小组所得到的人类 iPS 细胞系也存在多种缺陷。在 human iPS(IMR90)细胞系中,仍可检测到外源 *Oct4* 基因的表达。在某些 human iPS (Foreskin)细胞系中,细胞向神经系统分化的能力受到限制,可能是由于整合的外源 *Oct4* 和 *Nanog* 基因的持续高表达。

6 讨论

6.1 影响 iPS 细胞建系的因素

6.1.1 接受转导的起始细胞量

在 Yamanaka 小组的实验中^[15],分别以 5×10^4 或 5×10^5 的 hDFs 细胞接受 4 因子的转导。结果,与 5×10^4 组相比,在 5×10^5 的组中形成的细胞克隆总数有所上升,而 iPS 细胞克隆的总数和比例反而下降。但用 BJ 细胞重复同等实验,在 5×10^4 和 5×10^5 组中,iPS 细胞克隆形成率无显著区别。由此假设,当诱导条件和筛选条件一定时,接受转导的起始细胞量和 iPS 细胞克隆形成率之间存在规律性关系。这一假设需要更多的实验数据以供分析。

6.1.2 筛选时间

从已有数据分析,iPS 细胞建系主要受筛选时间、筛选方法和诱导因子组合等因素的影响(见表 1)。Yamanaka 小组和 Jaenisch 小组都证明,当使用

表 1 iPS 细胞建系方法比较

Table 1 Comparison of approaches for iPS cell line establishment

iPS cell line	Combination of exogenous induction factors	Selection timing after retroviral transduction	Selection method	iPS colony forming efficiency	Reference
Fbx15 iPS	<i>Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc</i>	3 d	Neomycin resistance	0.01%-0.5%	[5]
Nanog iPS-a*	<i>Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc</i>	7 d	Puromycin resistance	0.001%-0.03%	[6]
Mouse iPS cell line	<i>Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc</i>	6 d	Neomycin resistance	0.05%	[12]
Oct4 iPS-a	<i>Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc</i>	6 d	Neomycin resistance	0.08%	[12]
Oct4 iPS-b	<i>Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc</i>	/	Morphology	0.5%	[17]
c-Myc ⁻ iPS-a*	<i>Oct4, Klf4, Sox2</i>	21 d	Puromycin resistance	0.025%**	[14]
c-Myc ⁻ iPS-b*	<i>Oct4, Klf4, Sox2</i>	/	Morphology	0.0045%**	[14]
Human iPS	<i>Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc</i>	/	Morphology	0.014%-0.034%**	[15]
Human iPS cell line	<i>Oct4, Sox2, Nanog, Lin-28</i>	/	Morphology	0.022%**	[16]
Human iPS(foreskin)	<i>Oct4, Sox2, Nanog, Lin-28</i>	/	Morphology	0.0095%**	[16]
Human c-Myc ⁻ iPS	<i>Oct4, Klf4, Sox2</i>	/	morphology	0%-0.001%**	[14]

* a or b are used to distinguish cell lines obtained by different labs; ** Data is not cited directly, but calculated from the context

同一种筛选方法时, 基因转导与克隆筛选之间的时间越长, 所获得的细胞克隆越同质化、越符合 ES 细胞的特性。Fbx15 iPS 细胞系不彻底的重编程状态, 也可能与筛选时间过早有关。

6.1.3 筛选方法

综合各篇文献的结果可知: 在 4 基因转导后的第 3 天进行抗性筛选, 表达内源性 *Fbx15* 的克隆已形成^[5], 而表达内源性 *Oct4*, *Nanog* 的克隆还未形成^[12]; 转导后的 24 h 即可检出碱性磷酸酶活性^[12], 而内源性的 *Oct4* 蛋白直到第 3 周才出现^[17]。这说明由特定因子诱导的重编程是一个多步骤的、存在时序性调控的过程。由此, 在筛选时间一定的条件下, 选择怎样的报告基因将直接影响克隆形成率和克隆特异性。比较各篇文献中的数据可知, *Oct4* 是比 *Nanog* 和 *Fbx15* 更加严紧的(Stringent)多能性筛选因子, 这也与它在干细胞特性维持中的核心作用相呼应^[18]。

另一方面, Jaenisch 小组报道的通过形态学标准筛选 iPS 细胞克隆的方法, 因为简化了对供体细胞的基因操作, 所以从理论上降低了基因突变率和潜在的不安全性^[17]。并且, 与抗性筛选法相比, 形态学筛选方法将 iPS 细胞克隆形成率提高了 5~10 倍。在两组人类 iPS 细胞建系实验中均采用了形态学筛选标准, 可见这一方法正在成为主流。

6.1.4 外源诱导因子的选择

c-Myc⁻ iPS 细胞建系的成功, 证实外源 c-Myc 表达不是 iPS 细胞建系的必要条件。这可能是因为, 在受体细胞(MEFs)中存在一定水平的 c-Myc 蛋白, 当外源 *Oct4*、*Sox2* 和 *Klf4* 在 MEFs 细胞中表达, 将招募细胞内源性的 c-Myc 蛋白参与诱导重编程, 并促进了内源性 c-Myc 的表达^[14]。

并且, Yamanaka 小组还检测了前述 4 因子的同族蛋白(Family proteins)在小鼠 iPS 细胞诱导重编程中的作用。结果发现, 有部分、而非全部同族蛋白可以替代现有诱导因子的作用。这组有趣的发现可以启发我们对干细胞调控网络灵活性的思考。

hES 与 mES 细胞中的多能性调控网络不尽相同^[19]。因此, 人类 iPS 细胞建系的诱导因子还需摸索。Yu J 等的实验证明, 在外源诱导因子中, 只有 *Oct4* 和 *Sox2* 是诱导重编程、形成人类 iPS 细胞克隆所必需的^[16]。在今后的实验中, 还应当进一步研

究、优化诱导重编程的外源基因组合。

6.2 诱导重编程的机制

有学者认为, iPS 细胞系可能源自受体细胞系中存在的少量多能干细胞^[15,20], 这种假说尚无确切的实验依据。从现有结果来看, 虽然存在细节上的不同, 但 iPS 细胞与 ES 细胞十分相似。纵览这批文献, 我们可以得到如下推论: (1) *Oct4*、*Sox2* 等就是主要的重编程功能因子。(2) 重编程的核心事件就是 *Oct4*, *Nanog* 等基因的内源性表达激活。*Fbx15* iPS 细胞的例子说明, 不彻底的重编程状态是与上述基因缺乏内源性表达相关的。(3) 内源性干细胞因子的表达一旦激活, 就可以在培养体系中长期维持细胞的多能性状态, 而外源基因被沉默。这说明外源干细胞因子只在重编程的起始阶段是必需的。诱导重编程是一个多步骤的、存在时序性调控的过程。

各外源因子在诱导重编程中的作用, 可以结合其内源性表达在干细胞多能性维持中的作用来探讨。其中, *Oct4* 和 *Sox2* 在 ES 细胞多能性维持中的核心作用已被大量阐述^[18, 21-23]。*Klf4* 对于维持 mES 细胞的表型和快速增殖有重要作用^[24], Yamanaka 认为, 它在诱导重编程中的作用可能有: 激活 *Nanog*^[25,26]; 与 c-Myc 一同维持 *p53* 与 *p21^{CIP1}* 通路之间的平衡^[27,28]; 调节组蛋白乙酰化水平^[29]。稳定表达 c-Myc 的 mES 细胞可不依赖于白血病抑制因子而保持其自我更新能力和多能性^[30]。c-Myc 被证明不是诱导重编程的必需因子, 它的作用可能是调节染色质的构象, 使其快速转变为可与 *Oct4*、*Sox2* 结合的状态^[31]。

与 mES 细胞中的情况相反, 在 hES 细胞中诱导外源 c-Myc 的持续表达会促使细胞向胚外内胚层或滋养外胚层分化, 或凋亡^[32]。*Nanog* 和 *Lin-28* 不是形成人类 iPS 细胞克隆所必需的。在 hES 细胞中, *Nanog* 与 *Oct4*、*Sox2* 协同作用, 共同结合在下游 353 种基因的启动子序列上。在由 *Oct4*、*Sox2* 与 *Nanog* 为核心形成的多能性维持的调控通路中, 还包括这三种因子表达水平的自反馈调节和整个通路内的负反馈调节^[22]。*Lin-28* 可能通过促进 IGF2 蛋白的翻译从而激活内源 c-Myc 蛋白的表达^[33]。

另一方面, *Oct4* 等因子与维持 ES 细胞多能性的信号通路之间存在怎样的联系, 目前仍知之甚少。在 iPS 细胞建系过程中, 是否激活了 *Oct4* 更上游的

调控基因/网络? 各信号通路的动态如何? 需要特别注意的是, 已知的小鼠和人类 ES 细胞多能性的调控网络几乎完全不同^[19,22]。可以推论, 小鼠及人类 iPS 细胞系各有其独特的多能性维持机制。

成体干细胞特性的维持离不开它所处的体内微环境(Niche), 干细胞体外培养需要添加外源因子的特定培养体系。iPS 细胞的出现是否提示我们, 在细胞中人为表达细胞外信号通路的特定靶基因产物, 就可以完全模拟体内环境对细胞各项生命活动的调控?

Stanford 小组报道了一种大规模预测和检验细胞内转录调控网络结构的方法, 并在 mES 细胞中获得初步证实^[36]。通过这种方法, 人们有可能在不久的将来发现全部多能性决定因子和重编程功能因子, 揭晓重编程的完整机制。

6.3 iPS 细胞临床应用的前景

iPS 细胞系的建立是干细胞领域的重大突破。但是, 在将 iPS 细胞应用于人类疾病治疗之前, 还有大量工作要做。iPS 细胞用于临床治疗的思路是: (1) 将患者的细胞诱导重编程为 iPS 细胞进行培养; (2) 通过基因工程, 修复 iPS 细胞中的基因缺陷; (3) 将 iPS 细胞在体外诱导分化为所需的细胞类型; (4) 移植回患者自体, 发挥治疗作用。这一设想如能实现, 将解决干细胞材料稀缺和免疫排斥问题, 理论上可以进行各器官的、无限次的治疗。

循着这一思路, Jaenisch 小组首先在人类疾病的小鼠模型中进行了尝试, 对人类镰状细胞白血病(Human sickle cell anemia)小鼠模型的治疗取得了初步成功^[34]。这无疑是十分鼓舞的。

但是, 对于 iPS 细胞临床应用的安全性, 仍应当非常审慎。对供体细胞的基因操作和反转录病毒转导的外源基因整合仍是临床应用的不安全因素。各国实验室也正为解决这一问题而努力。形态学筛选方法可以降低供体细胞的突变发生率。不含 *c-Myc* 的诱导因子组合消除了外源 *c-Myc* 的潜在致癌作用。Jaenisch 小组的做法是, 在转染 4 因子的同时感染编码 Cre 重组酶(Cre-recombinase)的腺病毒载体, 从而删除外源 *c-Myc* 拷贝^[34]。如前所述, 外源干细胞因子只在重编程的起始阶段是必需的。那么, 能否通过瞬时表达系统一过性的表达外源基因, 或将关键诱导基因的蛋白产物直接导入供体细胞, 从而

引发重编程?

美国爱荷华州大学的 Bickenbach 小组报道^[37], 在小鼠分化细胞中一过性的表达外源 *Oct4*, 就足以使细胞暂时回复(部分)多分化潜能, 也即 *Oct4* 单独作用即可引发(一定程度的)重编程。因此, 也有可能不需要建立干细胞系, 而在外源干细胞因子表达的时间窗口内, 通过条件培养体系诱导分化细胞的转分化(Transdifferentiation)。这又为再生医学开辟了一条新的实验思路。

自 iPS 细胞面世以来, 世界媒体广泛报道, 所引起的关注和热议远远超出了科学界的范畴。它绕开了胚胎操作的伦理难题, 大大加速了干细胞研究的发展。它可以代替 ES 细胞应用于疾病研究和新药筛选。可以预见, 有朝一日, 人们将有能力完成干细胞——体细胞之间的可逆转换, 最终实现为患者个性化定制的干细胞治疗方案。在 21 世纪, 干细胞的临床应用将迎来光明前景!

REFERENCES

- [1] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 2006, **441**(7097): 1061-1067.
- [2] Egli D, Rosains J, Birkhoff G, *et al.* Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature*, 2007, **447**(7145): 679-685.
- [3] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, *et al.* Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, **309**(5739): 1369-1373.
- [4] Tokuzawa Y, Kaiho E, Maruyama MT, *et al.* Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(8): 2699-2708.
- [5] 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.
- [6] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, **448**(7151): 313-317.
- [7] Chen T, Ueda Y, Xie S, *et al.* A novel Dnmt3a isoform produced from an alternative promoter localizes to euchromatin and its expression correlates with active *de novo* methylation. *J Biol Chem*, 2002, **277**(41): 38746-38754.
- [8] Azuara V, Perry P, Sauer S, *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol*, 2006, **8**(5): 532-538.
- [9] Zvetkova I, Apedaile A, Ramsahoye B, *et al.* Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2005, **37**(11): 1274-1279.
- [10] Silva J, Mak W, Zvetkova I, *et al.* Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome

- requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell*, 2003, **4**(4): 481–495.
- [11] Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, 2003, **300**(5616): 131–135.
- [12] Wernig M, Meissner A, Foreman R, *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007, **448**(7151): 318–324.
- [13] Eggan K, Akutsu H, Loring J, *et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(11): 6209–6214.
- [14] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2007, **26**(1): 101–106.
- [15] 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.
- [16] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917–1920.
- [17] Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, **25**(10): 1177–1181.
- [18] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 2000, **24**(4): 372–376.
- [19] Rao M. Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol*, 2004, **275**(2): 269–286.
- [20] Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**(9): 778–784.
- [21] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 2003, **17**(1): 126–140.
- [22] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005, **122**(6): 947–956.
- [23] Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, *et al.* Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005, **280**(7): 5307–5317.
- [24] Li Y, McClintick J, Zhong L, *et al.* Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 2005, **105**(2): 635–637.
- [25] Lin T, Chao C, Saito S, *et al.* p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(2): 165–171.
- [26] Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*, 2005, **7**(11): 1074–1082.
- [27] Seoane J, Le HV, Massague J. Myc suppression of the p21 (Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, 2002, **419**(6908): 729–734.
- [28] Zhang W, Geiman DE, Shields JM, *et al.* The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem*, 2000, **275**(24): 18391–18398.
- [29] Evans PM, Zhang W, Chen X, *et al.* Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(47): 33994–34002.
- [30] Cartwright P, McLean C, Sheppard A, *et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 2005, **132**(5): 885–896.
- [31] Fernandez PC, Frank SR, Wang L, *et al.* Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev*, 2003, **17**(9): 1115–1129.
- [32] Sumi T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N, *et al.* Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene*, 2007, **26**(38): 5564–5576.
- [33] Polesskaya A, Cuvellier S, Naguibneva I, *et al.* Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev*, 2007, **21**(9): 1125–1138.
- [34] 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.
- [35] Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**: 55–70.
- [36] Walker E, Ohishi M, Davey RE, *et al.* Prediction and testing of novel transcriptional networks regulating embryonic stem cell self-renewal and commitment. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**: 71–86.
- [37] Grinell KL, Yang B, Eckert RL, *et al.* De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. *J Invest Dermatol*, 2007, **127**: 372–380.