

细胞重编程：再生医学研究的革命性突破

——写在 2012 年诺贝尔生理学或医学奖颁布之际

孟 姝 田 勇*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00543

1 2012 年诺贝尔生理学或医学奖

2012 年 10 月 8 日, 瑞典皇家科学院诺贝尔奖委员会宣布将 2012 年度诺贝尔生理学或医学奖 (The Nobel Prize in Physiology or Medicine) 授予英国发育生物学家约翰·戈登 (John Bertrand Gurdon) 和京都大学物质-细胞统合系统据点 iPS 细胞研究中心主任山中伸弥 (Shinya Yamanaka), 以表彰他们“发现成熟体细胞可被重编程恢复多能性”, 即体细胞重编程。约翰·戈登获奖的经典实验是基于成熟的核移植技术, 他首先将爪蟾卵母细胞的细胞核取出, 然后再注入一个成年爪蟾小肠细胞的细胞核, 获得一个体细胞核移植胚胎。这个通过人工手段重构的胚胎最终成功发育为一个健康存活的爪蟾^[1]。这项经典实验证明: 处于高度分化状态的体细胞可以通过重编程手段发生逆转, 回到早期胚胎的未分化状态, 且具有发育为整个成体动物个体的潜能。这一发现打破了当时科学界关于细胞命运不能逆转的传统认识, 是细胞重编程领域的里程碑。另一位获奖者山中伸弥创造了诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSCs) 这一项具有突破性的技术, 即利用逆转录病毒载体将 4 个可维持 ES 细胞自我更新和多潜能性的转录因子, Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc, 导入成体小鼠成纤维细胞, 诱导体细胞回归到一个类似于胚胎干细胞的、未分化、具有高度发育潜能的状态^[2]。iPS 技术使成人体细胞转变为多能干细胞成为可能, 是生命科学基础研究和医学领域一项革命性的科学突破, 它回避了历时已久的伦理争议, 必将在人类疾病研究和再生医学等领域发挥巨大的应用潜力。

2 细胞重编程的研究历史

2.1 体细胞核移植的重编程

1928 年, 德国生物学家汉斯·斯佩曼 (Hans Spemann) 首次提出体细胞核移植的重编程理念 (简称动物克隆), 即通过人工手段将体细胞核移入去核的卵母细胞中, 从而获得动物个体。1952 年, 美国科学家伯内格斯 (Briggs R) 和金 (King TC) 最早成功完成细胞核移植实验, 首次将青蛙胚胎期细胞的细胞核移入去核的蛙卵细胞中, 获得了存活的蝌蚪, 证明胚胎期细胞可以被重编程^[3]。1958 年, Gurdon 通过体细胞核移植技术获得了首例健康存活的爪蟾。这一里程碑式的发现获得了 2012 年诺贝尔生理学或医学奖。1963 年, 我国发育生物学先驱童第周先生在体细胞核移植领域也做出了重要贡献, 首次完成了鲤鱼的核移植实验, 成功获得了健康的鲤鱼^[4]。

高等哺乳动物的体细胞是否能同低等动物一样被重编程? 1996 年“多莉羊”的出世打破了这一疑虑, 高等哺乳动物的体细胞也可以被完全重编程^[5]。十几年来, 在小鼠、大鼠、猪、牛等多达 10 多种哺乳动物中相继获得了克隆动物。体细胞核移植这项技术在基础理论研究中被广泛采用, 但是该技术技巧性极高很难推广, 且成功率低下, 又存在伦理学问题, 很难运用于人类疾病治疗。

* 通讯联系人。

Tel: 010-64888579, E-mail: ytian@ibp.ac.cn

收稿日期: 2012-11-02, 接受日期: 2012-11-07

2.2 诱导多能干细胞

2006年, 日本科学家 Yamanaka 简单地将 4 个基因(Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)导入成体小鼠成纤维细胞中, 诱导体细胞回归到一个类似于胚胎干细胞的、未分化、具有高度发育潜能的状态, 从而创造了诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSCs)新技术^[2]. 2007年, Yamanaka 与美国 Thomson 研究组分别成功地将分化的人体细胞重编程为多潜能性的干细胞^[9]. iPSC 技术不需要人类卵子, 也不需要制造或破坏胚胎, 是一项避开克隆伦理和技术障碍的里程碑式的科学突破. 2009年, 中国科学院动物研究所周琪研究组首次利用 iPSC 细胞, 通过四倍体囊胚注射得到存活并具有繁殖能力的小鼠, 从而在世界上第一次证明了 iPSC 细胞的全能性^[7]. 这一重大成果为 iPSC 技术在治疗性克隆及再生医学领域的应用奠定了基础.

3 重编程细胞的研究方向

iPS 技术发明以来, 该领域的研究重点主要集中在获得不同来源的 iPS 细胞、提高重编程的安全性、提高细胞重编程效率以及重编程的机制研究.

3.1 不同来源的 iPS 细胞

利用逆转录病毒载体将 4 个可维持 ES 细胞自我更新和多潜能性的转录因子, Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc, 导入小鼠或成人体细胞可诱导产生具有多向分化潜能的 iPS 细胞, iPS 在形态学、增殖、表面抗原、基因表达、多能细胞特异性基因的表现遗传状态以及端粒酶活性方面都和胚胎干细胞(ES)相似. 成体细胞从去分化到重编程为 iPSCs 一般需要 2~4 周的时间, 是一个缓慢的过程. 在小鼠

上, 用小鼠成纤维细胞作为重编程靶细胞, 导入 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 转录因子, 在小鼠胚胎干细胞(mES)培养条件下, 约 10~16 天即可获得小鼠 iPS 细胞. 诱导人 iPS(hiPS)细胞则较慢, 首先从人体获得皮肤成纤维细胞、关节滑膜组织和新生儿包皮成纤维细胞, 作为重编程的靶细胞, 再利用携带多潜能性的转录因子 hOct4、hSox2、hKlf4 和 hc-Myc 的逆转录病毒转染人成纤维细胞(图 1), 在人胚胎干细胞(hES)培养体系下诱导细胞, 约 30 天后, 可见类似于 hES 细胞的 iPS 克隆, 当 iPS 细胞被完全重编程, 则不再依赖转录因子的表达. hES 细胞有丝分裂指数低, 因此 hiPS 细胞传代时间也比小鼠系统要长^[5,8]. Yu 等^[6]用 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 这 4 个因子也可以使人体细胞重新编程为具 ES 特性的 hiPS 细胞. 目前已证实使用逆转录病毒和慢病毒等介导的 4 个因子转染体系几乎可以将各种类型的成体细胞重编程为 iPSCs, 如成纤维母细胞、肝细胞、胃上皮细胞、胰腺细胞、神经前体细胞、肾上腺、肌肉细胞、间充质干细胞、表皮干细胞、脐带及羊膜细胞和造血细胞等, 但不同组织体细胞诱导重编程的水平不同, 形成 iPSCs 的效率及效能也不同^[9]. Karow 和 Sanchez^[10]利用病毒介导的两种转录因子 Sox2 和 Mash1 将人大脑血管周皮细胞直接重编程为神经元. 这项发现为开发出细胞疗法来治疗诸如阿尔茨海默病和帕金森病之类的神经退行性疾病奠定基础. 从针对不同细胞类型作为重编程起始细胞的研究中可以看出, 成体干细胞可能是效率最高的一种, 但是从外周血以及尿液中获取的细胞由于其方便获取性, 也具有优势.

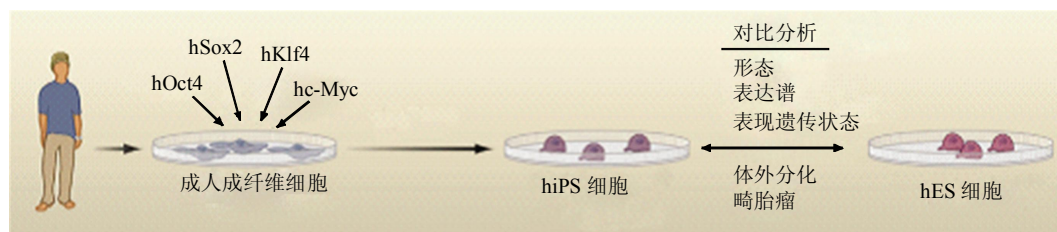


Fig. 1 Transcription factor-induced pluripotency^[8]

图 1 转录因子诱导多能性^[8]

从人体获得成人成纤维细胞, 利用逆转录病毒导入 4 个转录因子, hOct4、hSox2、hKlf4 和 hc-Myc, 诱导产生 hiPS 细胞, 经过与 hES 细胞的对比分析, 可鉴定 iPSC 细胞是否被完全重编程.

3.2 提高重编程细胞的安全性

由于使用病毒转染体系的“一步法诱导 iPSC”

容易引发致癌基因的活性, 形成肿瘤, 在研究和应用中具有重大的安全隐患, 必须对其加以改进. 目

前针对重编程因子更安全的传递方法主要包括附着载体, mRNA 转染, 以及重组蛋白传导. 2009年, 俞君英等^[11]在《科学》杂志(*Science*)上发表文章, 利用一种简单的 oriP/EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1)为基础的非整合型附着载体(episomal vectors)转染方法获得了人类 iPS 细胞, oriP/EBNA1 载体来自 EB 病毒, 非常适合于作为将重新编程因子引入人类体细胞的载体, 因为这些质粒无需病毒包装就能转染, 并且由于没有药物筛选性, 在培养过程中就能被去除. 在去除掉附着体后, 这些 iPS 细胞就成为了没有外来 DNA 的 iPS 细胞, 从而解决了可能癌变的问题^[11]. mRNA 转染即是直接使用转录因子的 mRNA, 或者成熟 microRNA 实现干细胞重编程, James Eberwine 等利用 mRNA 重编程体细胞, 可直接将成纤维细胞和星形胶质细胞转分化为心肌细胞^[12]. 这些研究不仅为临床治疗提供基础, 也进一步探讨了重编程的机制. 哈佛大学干细胞研究中心的研究人员首次成功地将人体成纤维细胞经 4 个重组蛋白(Oct4, Sox2, Klf4 和 c-Myc)以及促进重组蛋白穿透细胞的多肽(cell-penetrating peptide, CPP)诱导转化成 iPS 细胞. 在 CPP 的帮助下, 重组蛋白进入成纤维细胞内, 促进细胞转化成 iPS 细胞^[13]. 近期, 斯坦福大学医学院的研究人员揭示逆转录病毒是通过激活一个细胞核重编程所必需的信号通路 toll-like receptor 3 (TLR3)而使细胞重编程, 同时还筛选出一种功能类似于病毒遗传物质的小分子物质来激活该通路, 这种蛋白质是非整合蛋白, 不参与基因组, 因此不必担心任何病毒引起的宿主基因组损伤^[14]. 目前, 相比其他 iPS 技术, 重组蛋白诱导 iPS 是一项健康风险最低的技术. 利用细胞渗透性蛋白可以赋予对重编程过程更高水平的控制, 有可能促成在人类治疗中使用 iPS 细胞.

3.3 提高重编程效率

iPS 细胞最初的诱导效率极低, 主要原因是通过病毒转染而获得的 4 个因子表达的细胞比例低. 除了 4 种必需的转录因子外, iPS 细胞可能还需要一种或几种因子通过逆转录病毒导入细胞来激活. 2008 年, 北京大学邓宏魁研究组首次将抑制肿瘤的抑制剂 p53 蛋白与 iPS 细胞的生成效率联系起来, 阐明了 p53 途径对细胞重编程的阻碍作用^[15]. 2010 年, 德国研究小组发现, 蛋白质 Brg1、Baf155 和 Ini1, 作为染色体重塑复合物可以显著提高体细胞转化为多能干细胞的效率^[16]. 培养条件和

环境对 iPS 细胞的诱导效率也有影响, iSF1 培养基可以只用 Oct4 和 Klf4 将脑膜细胞重编程为 iPS 细胞, 利用基因敲除血清替代物(KOSR)代替胎牛血清, 以及通过加入调控细胞代谢和组蛋白修饰的小分子来提高重编程效率^[17-18]. 裴端卿研究组发现细胞内发生能量代谢变化时会产生大量的活性氧(ROS)成分, 而导致细胞老化, 这可能是造成 iPS 细胞转化效率低的原因. 因此他们在培养基里添加抗氧化剂来提高体细胞重编程效率, 最终发现维生素 C 可以大大提高重编程效率^[19]. 进一步研究发现, 维生素 C 是通过 Jhdm1a/1b 诱导 H3K36me2/3 脱甲基化促进体细胞重编程. 维生素 C 和 Jhdm1b 协同作用可促进细胞增殖, 抑制细胞衰老^[20]. iPS 细胞培育和维持主要是通过静态皿贴壁培养, 而近期两个研究小组分别利用搅拌悬浮培养液进行小鼠 iPS 细胞有效培养, 证明了固体基质并不是重编程的必要条件. 悬浮培养重编程诱导多能干细胞是 iPS 培养技术的提高, 有利于将 iPS 产业化, 而且有助于 iPS 分子作用机制的研究^[21].

3.4 重编程的机制研究

虽然采用反转录病毒将转录因子导入受体细胞使其重编程的方法已被多个研究组的实验结果所证实, 但诱导后发生重编程的分子机制仍需更深入的研究. 转录因子诱导的重编程是否真正重启了成纤维细胞基因组的表观遗传状态, 使其达到多能干细胞的水平, 还需要更新的技术手段完善检测. 2012 年 9 月, Rudolf Jaenisch 领导的研究组在《细胞》杂志(*Cell*)上指出, 他们确定了生成 iPSCs 的重编程因子新组合, 该研究组第一次检测了在细胞转变为多能状态过程中单个细胞的遗传改变. 通过将小鼠胚胎成纤维细胞重编程过程分为几个不同阶段, 测量 48 个已知或者据推测参与多能性的基因表达水平, 从而对产生 iPSC 的细胞、没有产生 iPSC 的细胞和只发生部分重编程的细胞的基因表达谱进行比较. 鉴定出 4 个基因, Esrrb、Utf1、Lin28 和 Dppa2, 在重编程过程的初始阶段——大约在导入重编程基因之后的 6 天, 就开始表达, 这 4 个基因控制着参与多能性的其他基因的转录^[22]. 重编程的机制研究在很长一段时期内都会是重编程领域内的重要问题, 想要完全揭示重编程的机制可能还有很长的路要走.

4 我国相关研究进展

iPS 细胞被视为未来再生医疗的重要材料, 目

前,国际上关于 iPS 细胞的研究可谓日新月异,是干细胞研究的热点领域之一.我国在 iPS 细胞研究领域的水平正得到国际研究界越来越多的认可.近年来中国在干细胞研究领域的投入飞速增长,巨大的资金投入、基础研究设施的建设和一流人才的回归使这一领域的研究获得了丰厚的成果^[23].前文已经提到我国科学家在 iPS 细胞研究的一些重要进展,近期,中国科学院广州生物医药与健康研究院裴端卿研究组揭示了形成 iPSCs 的重编程过程的起始机制.他们发现 4 个重编程因子 oct4/sox2/klf4/myc 协同作用,在抑制维系成纤维细胞特征的关键转录因子 Snail 和 Tgfb 信号传导的同时也激活了表皮细胞特征基因表达,启动间充质-表皮细胞转换过程(MET),从而打开了通向多能干细胞的道路, MET 也是体细胞重编程为多能干细胞的必需过程.这一发现不仅是诱导多能干细胞机理研究的突破性进展,也为继续改进诱导多能干细胞技术提供了理论依据^[24-25].中国科学院动物研究所周琪研究组通过外源因子诱导中胚层来源的睾丸支持细胞,使之重编程为外胚层来源的神经干细胞(iNSCs),并鉴定出获得的 iNSCs 具有自我更新和分化为神经元的能力.该实验证明 iNSCs 将会成为一种用于临床治疗神经退行性疾病和新药物筛选的细胞资源^[26].近期,周琪研究组首次利用基因修饰的小鼠单倍体胚胎干细胞得到健康成活的转基因小鼠,是研究隐性遗传基因的理想模型^[27].北京生命科学研究所高绍荣研究组利用 iPS 技术从一位 β 41/42 纯合子贫血症病人的体细胞诱导获得了十几株 β 地中海贫血症 iPS 细胞,并将病人特异的 iPS 细胞系和基因修复的 iPS 细胞系分别进行体外定向造血分化,建立了体内移植的 SCID 小鼠模型.这项工作为最终利用 iPS 技术治愈 β 地中海贫血等遗传性疾病奠定了基础^[28].中国科学院生物物理研究所刘光慧研究组首次结合多能干细胞和基因组靶向修饰技术揭示了帕金森病神经干细胞随着衰老过程而发生的退行性病变.这一研究成果为诊断、预防与治疗帕金森病提供了新的潜在靶点^[29].

5 iPS 细胞的应用前景

人们研究细胞重编程的最终目的,是让这项技术能够为人类的健康服务,因此重编程技术的临床转化将成为未来的研究热点. iPSCs 在再生医学、组织工程等方面都有潜在的应用价值. iPSCs 的出现使得病人特异性的干细胞获得成为可能,由病人

特异性的 iPSCs 分化得到的特异性前体细胞和成熟细胞可应用在组织器官移植治疗、基因治疗、药物筛选模型的建立,以及特异疾病分子机制的研究等多方面. iPS 细胞从研究理论走向临床应用还需要国内外相关专家共同努力.另外,干细胞研究的飞速发展也带来了政策、管理和临床预期等方面的严峻挑战,政策制定者、基础研究工作者和相关临床医生在这一过程中必须重视并共同应对.在我国,卫生部即将颁布《干细胞临床研究管理办法》和《干细胞临床研究基地管理办法》,这将进一步规范我国干细胞治疗的临床前研究、临床试验和应用,推动我国干细胞与再生医学的健康发展.

参 考 文 献

- [1] Gurdon J B, Elsdale T R, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*, 1958, **182**(4627): 64-65
- [2] 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
- [3] Briggs R, King T J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, **38**(5): 455-463
- [4] Tong D Z, Wu S Q, Ye Y F, *et al.* Nuclear transfer in fishes. *Sci Bull*, 1963, **7**: 60-61
- [5] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385** (6619): 810-813
- [6] Yu J Y, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917-1920
- [7] Zhao X Y, Li W, Lü Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation near-final version. *Nature*, 2009, **461**(7260): 86-90
- [8] Zaehres H, Schoer H R. Induction of pluripotency: From mouse to human. *Cell*, 2007, **131**(5): 834-835
- [9] Kaji K, Norrby K, Paca A, *et al.* Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, **458**(7239): 771-775
- [10] Karow M, Sanchez R, Schichor C, *et al.* Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell*, 2012, **11**(10): 471-476
- [11] Yu J Y, Hu K J, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, **324**(5928): 797-801.
- [12] Kim T K, Sul J, Peterenko N B, *et al.* Transcriptome transfer provides a model for understanding the phenotype of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(29): 11918-11923
- [13] Kim D, Kim C H, Jung-II Moon, *et al.* Generation of human

- induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(6): 472-476
- [14] Lee J, Sayed N, Hunter A, *et al.* Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell*, 2012, **151**(3): 547-558
- [15] Zhao Y, Yin X L, Qin H, *et al.* Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 475-479.
- [16] Kim K, Doi A, Wen B, *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, **467**(7313): 285-290
- [17] Cai J, Li W, Su H, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biological Chemistry*, 2010, **285**(15): 11227-11234
- [18] Zhao X Y, Li W, Lü Z, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells using alternative culture medium. *Cell Research*, 2010, **20**(3): 383-386
- [19] Esteban M A, Pei D. Vitamin C improves the quality of somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2012, **44**(4): 366-367
- [20] Wang T, Chen K, Zeng X, *et al.* The histone demethylases *Jhdm1a/1b* enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011, **9**(6): 575-587
- [21] Chen J, Pei D. Reprogramming in suspension. *Nat Methods*, 2012, **9**(5): 449-451
- [22] Buganim Y, Faddah D A, Cheng A W, *et al.* Single-cell gene expression analyses of cellular reprogramming reveal a stochastic early and hierarchic late phase. *Cell*, 2012, **150**(6): 1209-1222
- [23] Yuan W, Sipp D, Wang Z Z, *et al.* Stem cell science on the rise in China. *Cell Stem Cell*, 2012, **10**(6): 12-15
- [24] Li R, Liang J, Ni S, *et al.* A Mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(1): 51-63
- [25] Esteban M A, Bao X, Zhuang Q, *et al.* The mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*, 2012, **22**(5): 423-428
- [26] Sheng C, Zheng Q, Wu J, *et al.* Direct reprogramming of Sertoli cells into multipotent neural stem cells by defined factors. *Cell Res*, 2012, **22**(1): 208-218
- [27] Li W, Shuai L, Wan H, *et al.* Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, **490** (7420): 407-411
- [28] Wang Y, Zheng C G, Jiang Y, *et al.* Genetic correction of β -thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res*, 2012, **22**(4): 637-648
- [29] Liu G H, Qu J, Suzuki K, *et al.* Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2[J/OL]. *Nature*, 2012 [2012-10-17]. <http://www.nature.com/DOI:10.1038/nature11557>