

诱导性多潜能干细胞(iPS cells) ——现状及前景展望*

申红芬^{1,3)**} 姚志芳^{1)**} 肖高芳¹⁾ 贾俊双¹⁾ 肖东^{1,2)***} 姚开泰^{1,3)***}

⁽¹⁾南方医科大学肿瘤研究所, 广州 510515; ⁽²⁾南方医科大学比较医学研究所暨实验动物中心, 广州 510515;

⁽³⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 主要从 iPS 细胞发展历程、获得 iPS 细胞的几个关键步骤(如基因导入方式、诱导 iPS 细胞所需因子组合与小分子化合物运用和体细胞种类选择等)、病人或疾病特异性 iPS 细胞、iPS 细胞体内外诱导分化与其衍生物的临床应用和制备无遗传修饰的(genetic modification-free) iPS 细胞的可行性与前景等方面对 iPS 细胞最新研究进展做评述。日本和美国研究小组先后用 4 种基因将小鼠(2006 年 8 月)和人(2007 年 11~12 月)的体细胞在体外重编程为诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells), 此后在短短两年多时间内, iPS 细胞的研究和关注度呈爆炸式增长。体细胞重编程、去分化和多潜能干细胞来源等一系列热点问题再次成为干细胞和发育生物学等研究的热点和焦点。与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)一样, iPS 细胞在体内可分化为 3 个胚层来源的所有细胞, 进而参与形成机体所有组织和器官。迄今, 在体外已由 iPS 细胞定向诱导分化出功能性的多种成熟细胞。因此, iPS 细胞研究不仅具有重要理论意义, 而且在再生医学、组织工程和药物发现与评价等方面极具应用价值。

关键词 体细胞重编程, 胚胎干细胞, 诱导性多潜能干细胞, 分化, 细胞治疗, 无遗传修饰的重编程方法, 小分子

学科分类号 Q813, Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00794

由于人的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)在再生医学、组织工程和药物发现与评价等领域极具应用价值, 科学家们曾尝试通过不同途径实现体细胞重编程以获取 ES 细胞或 ES 细胞样的细胞或多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS cells), 这些途径主要包括: a. 体细胞核移植, b. 体细胞与多潜能细胞融合后的重编程, c. 将分化的体细胞在卵细胞或多潜能干细胞的抽提物中孵育以实现体细胞重编程, d. 体细胞经特定因子诱导重编程为 iPS 细胞^[1~4]。虽然运用前 3 种方法可以获得多潜能干细胞, 但是这些方法的广泛应用在技术、细胞来源、免疫排斥、伦理、宗教和法律等方面存在诸多限制, 而 iPS 细胞不受这些问题的限制并且制备简单易行, 故 iPS 细胞一经问世, 即在生命科学领域引起了一次轰动, 被誉为生命科学领域新的里程碑。什么是 iPS 细胞呢? 简单来说就是借助基因导入技术将某些特定因子导入动物或人的体细胞, 同时可选择性地在培养液中加入特定的小分子物质, 即可将体细胞重编程为多潜能干细胞,

此类细胞在克隆形态、生长特性、表面标志物、基因表达模式、表观遗传学特征、拟胚体(embryoid bodies, EBs)形成、畸胎瘤(teratoma)形成和嵌合体(chimeras)形成(针对小鼠)等方面与 ES 细胞非常相似。本文主要从 iPS 细胞发展历程、获得 iPS 细胞所需因子组合与小分子化合物运用和体细胞种类选择等)、病人或疾病特异性 iPS 细胞、iPS 细胞体内外诱导分化与其衍生物的临床应用和制备无遗传修饰的 iPS 细胞的可行性与前景等方面对 iPS 细胞最新研究进展做评述。此外, 有关 iPS 细胞早期和其

* 国家自然科学基金委员会 - 广东省联合基金重点项目(u0732006), 国家自然科学基金资助项目(30271177), 广东省卫生厅基金(A2007359), 南方医科大学优秀中青年科技人才库科研资助金, 广州地区科学仪器协作共用网专用基金(2006176)和广东省自然科学基金(9151063101000015)资助项目。

** 共同第一作者, *** 通讯联系人。

肖东. Tel: 020-62789439, E-mail: Xiao_d@hotmail.com

姚开泰. Tel: 020-61648225, E-mail: ktyao@fimmu.com

收稿日期: 2008-11-18, 接受日期: 2009-04-10

他方面的进展, 可参见其他中文综述^[1, 5~10].

1 iPS 细胞发展历程

如表 1 所示^[11~47], 2006 年 8 月, Yamanaka 小组将 24 种转录因子排列组合导入小鼠成纤维细胞, 最终确定最少有 4 种转录因子组合——Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 即可将成纤维细胞重编程为 iPS 细胞^[11], 2007 年 11~12 月, Yamanaka 小组和 Thomson 小组先后将人的体细胞重编程为 iPS 细胞^[12, 13]. 这之后 iPS 细胞的研究和关注度呈爆炸式增长(表 1), 且取得了一些突破性进展, 如建立了

疾病特异的人 iPS 细胞^[28, 29]、借助转座子介导的转基因方法高效制备了 virus-free iPS 细胞^[45, 46]以及成功地从所获得的 iPS 细胞中移除先前导入的转录因子基因^[45~47]. 在利用特定小分子化合物的情况下, 更少的外源基因导入即可高效率获得 iPS 细胞, 这向制备无遗传修饰的 iPS 细胞方面迈出了一大步^[20, 23, 24, 26, 37, 39, 40, 45~48], 此外, 亦建立了大鼠和猴的 iPS 细胞系^[41~43], 其余进展详见表 1, 这些成绩将 iPS 细胞在临床上的实际应用又大大向前推进了一步, iPS 细胞研究和应用将有望成为 21 世纪最伟大的医学生物学成就之一.

Table 1 The history of induced pluripotent stem cells (iPS cells)
表 1 诱导性多潜能干细胞 (iPS cells) 大事记

时间	主要事件	参考文献
2006-08-25	Yamanaka 小组利用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种基因将小鼠成纤维细胞诱导为 iPS 细胞	[11]
2007-11-30	Yamanaka 小组利用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种基因将人皮肤成纤维细胞重编程为 iPS 细胞	[12]
2007-12-21	Thomson 小组利用 Oct4、Sox2、Nanog 和 Lin28 4 种基因将人的体细胞重编程为 iPS 细胞	[13]
2007-12-21	Jaenisch 小组用 iPS 细胞来源的造血前体细胞成功治疗镰状红细胞贫血, 这从理论和实践上为人类单基因遗传病治疗奠定基础	[14]
2008-01-00	Yamanaka 小组和 Jaenisch 小组利用 Oct4、Sox2 和 Klf4 3 种基因将鼠和人成纤维细胞重编程为更安全的 iPS 细胞	[15, 16]
2008-01-10	Daley 小组运用 4 种或 6 种因子组合将多种人体细胞(不同来源或处于不同发育阶段)重编程为 iPS 细胞	[17]
2008-04-15	Jaenisch 小组证实鼠 iPS 细胞来源的多巴胺能神经元移植进帕金森病大鼠脑内, 可有效缓解其症状和改善其行为, 说明 iPS 对复杂疾病治疗的可能性	[18]
2008-04-18	Jaenisch 小组运用 Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 和 C-EBP α 将终末分化的鼠成熟 B 细胞重编程为 iPS 细胞	[19]
2008-06-05	Ding 小组利用 Oct4 和 Klf4 与 G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂 BIX-01294 (BIX)组合将神经干细胞高效率重编程为 iPS 细胞	[20]
2008-06-24	Hochedlinger 小组利用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种基因将鼠胰腺 β 细胞重编程为 iPS 细胞	[21]
2008-06-31	Schöler 小组利用 Oct4 和 Klf4 2 种基因将鼠神经干细胞重编程为 iPS 细胞	[22]
2008-07-03	Meissner 小组证实 5'-azacytidine 可有效提高 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种因子将体细胞重编程为 iPS 细胞的效率	[23]
2008-07-00	Melton 小组证实组蛋白去乙酰化酶抑制剂 valproic acid (VPA)极大提高体细胞重编程为 iPS 细胞效率	[24]
2008-08-01	Yamanaka 小组利用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 基因将小鼠成年肝细胞和胃细胞重编程为 iPS 细胞	[25]
2008-08-07	Jaenisch 小组证实 Wnt3a 可有效提高 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种因子将体细胞重编程为 iPS 细胞的效率	[26]
2008-08-28	利用 miRNA-302s 将人肿瘤细胞重编程为 iPS 细胞	[27]
2008-08-29	由 ALS 病人人体细胞制备的疾病特异的人 iPS 细胞在体外可定向诱导分化为运动神经元	[28]
2008-09-05	Daley 小组成功建立一系列人疾病特异的人 iPS 细胞系	[29]
2008-02-07	Jaenisch 小组和 Hochedlinger 小组为更好地研究体细胞重编程为 iPS 细胞的机制建立了药物可诱导的系统, 该系统是一种新的、可预测的和重复性好的研究平台	[30~33]
2008-09-11		
2008-09-25	Hochedlinger 小组和 Yamanaka 小组利用腺病毒载体(Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 个基因或 Oct4、Sox2 和 Klf4 3 个基因整合于同载体上)成功制备 virus-free adeno-iPS 细胞, 证明将体细胞重编程为 iPS 细胞无需病毒载体整合进宿主基因组	[34, 35]
2008-10-09		
2008-10-02	Melton 小组利用 Ngn3、Pdx1 和 Maf 3 种转录因子在小鼠体内将成年胰腺外分泌细胞重编程为分泌胰岛素的 β 细胞	[36]
2008-10-12	Melton 小组证实 Oct4 和 Sox2 与 VPA 组合运用可将人成纤维细胞重编程为 iPS 细胞	[37]
2008-10-17	Belmonte 小组运用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 将人角质形成细胞高效而快速重编程为 iPS 细胞	[38]
2008-10-21	Smith 小组证实 Oct4 和 Klf4 与 PD0325901 和 CHIR99021 组合运用可有效将体细胞重编程为 iPS 细胞	[39]
2008-11-06	Ding 小组利用 Oct4 和 Klf4 与小分子 BIX 和 BayK8644 组合将小鼠成纤维细胞高效率重编程为 iPS 细胞	[40]
2008-12-04	Deng 小组建立了猴 iPS 细胞系, Xiao 小组和 Ding 小组分别建立了大鼠 iPS 细胞系.猴和大鼠 iPS 细胞系的建立说明利用 iPS 细胞技术亦可简便地建立其他物种的胚胎干细胞样细胞系	[41~43]
2009-01-09		
2009-01-20	Ma 小组用从 iPS 细胞诱导来的内皮前体细胞和内皮细胞成功治疗血友病 A, 这从理论和实践上为人类单基因遗传病治疗奠定了基础	[44]
2009-03-01	Nagy 小组和 Kaji 小组采用转座子法取代病毒介导的基因投递方法高效率制备了 virus-free 鼠 iPS 细胞, 同时获得 iPS 细胞后, 又成功将先前导入的转录因子基因从 iPS 细胞中移除	[45, 46]
2009-03-06	Jaenisch 小组将移除外源基因的人 iPS 细胞成功诱导成多巴胺神经元, 该成果为人帕金森氏症的治疗带来福音	[47]

2 制备 iPS 细胞的几个关键步骤和环节

目前, iPS 细胞制备流程及其鉴定如图 1 所示, 简言之: a. 分离和培养宿主细胞; b. 通过病毒(逆转录病毒、慢病毒或腺病毒)介导的方式将外源基因导入宿主细胞; c. 将病毒感染后的细胞种植于饲养层细胞上, 并于 ES 细胞专用培养体系中培养, 同时在培养液中根据需要加入相应的小分子物质(如 Wnt3a、5-AZA、BIX-01294、VPA、

TSA、BayK8644、PD0325901 或 CHIR99021 等)以促进重编程; d. 数天后, 出现 ES 克隆样的克隆; e. 在细胞形态、基因表达谱、表观遗传学、畸胎瘤形成和体外分化等方面对这些克隆进行鉴定. 鉴于刘爽等^[9]已对制备 iPS 细胞的一般过程及其鉴定做了较详细的描述, 此不赘言. 此外, Takahashi 等^[49]和 Park 等^[50]分别描述了制备小鼠和人 iPS 细胞的详细步骤. 本部分仅结合 iPS 细胞最新研究进展对一些关键步骤和环节加以评述.

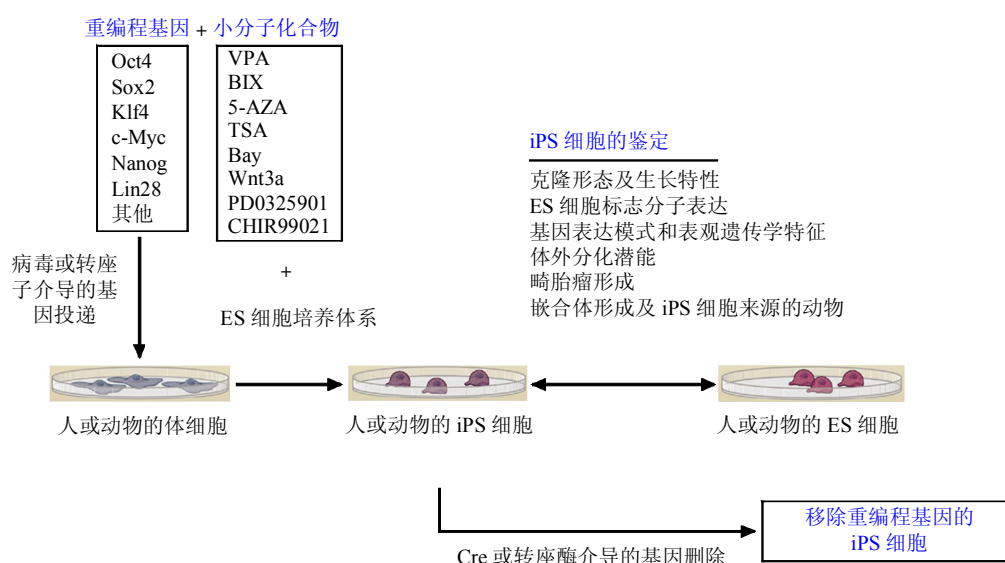


Fig. 1 A combined genetic and chemical approach for generating iPS cells from somatic cells

图 1 联合运用遗传的和化学的方法将体细胞重编程为 iPS 细胞

VPA: 丙戊酸(valproic acid); TSA: 曲古抑菌素 A(Trichostatin A); 5-AZA: 5-氮杂胞苷(5-aza-cytidine); BIX: BIX-01294; Bay: 钙通道激动剂 BayK8644.

2.1 体细胞种类选择原则和体细胞重编程为 iPS 细胞所需因子组合确定原则

表 2、表 3 和表 4 展示了迄今通过不同转录因子的组合或额外加入小分子, 将小鼠或人的体细胞重编程为 iPS 细胞的情况. Yamanaka 小组用 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 4 种转录因子组合先后将小鼠和人的成纤维细胞在体外诱导为 iPS 细胞^[11, 12], 这之后不同的研究小组又运用相似的方法和采用不同因子的组合证实了该方法的可行性, 同时也发现, 被逆转的细胞不局限于特定的细胞类型及特定的分化阶段, 其可以是内中外三胚层任一胚层来源的细胞, 既可以来源于胚胎细胞也可以来源于新生儿、成人甚至是终末分化的成熟细胞(表 2、表 3 和表 4), 只是不同胚层来源的细胞或不同发育阶段的细胞重编程为 iPS 细胞的难易不同、效率

不同、所需因子组合不同或形成克隆所需时间不同而已. Jaenisch 小组借助新近建立的药物可诱导系统来研究体细胞重编程为 iPS 细胞, 得出如下结论: a. 不同诱导水平的重编程因子均可将体细胞诱导为 iPS 细胞; b. 转录因子转基因活性的持续时间与重编程效率有直接相关性; c. 许多不同组织来源的体细胞均可被重编程; d. 不同类型体细胞重编程为 iPS 细胞所需转录因子诱导水平是不同的^[49]. 总之, 任何一种(小鼠和人的)体细胞在理论上均可被这些转录因子重编程为 iPS 细胞. 由于人的血细胞(如 T 细胞和 B 细胞等)、脂肪细胞和皮肤成纤维细胞取材方便及来源广泛, 故此类人的体细胞是较为理想的供体细胞, 适用于建立“个体特异的”、“病人特异的”或“疾病特异的”iPS 细胞.

Table 2 iPS cells generated from multiple tissues and cell types by the combinational use of defined factors

表 2 不同因子组合将小鼠的不同类型细胞诱导为 iPS 细胞

体细胞种类	因子组合	参考文献
成体成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[11, 51,52]
	Oct4, Sox2, Klf4	[15, 16]
胚胎成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[11, 51~54]
	Oct4, Sox2, Klf4	[15]
	Oct4, Sox2, Esrrb	[55]
肾上腺细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
肾细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
肌细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
胎鼠肝细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[34]
肝细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[25, 34]
造血系细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
胃上皮细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[25]
肠上皮细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
角质形成细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
成熟 B 淋巴细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, C/EBP α	[19]
脑膜细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[56]
间充质干细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51]
神经祖细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[51, 57]
	Oct4, Klf4, c-Myc	[57]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[20, 58]
	Oct4, Sox2, Klf4	[20]
	Oct4, Klf4, c-Myc	[58]
胰腺 β 细胞	Oct4, Klf4	[20, 22]
	Oct4	[59]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[21]

Table 3 iPS cells derived from various human cell by defined factors

表 3 不同因子组合将人的不同类型细胞诱导为 iPS 细胞

体细胞种类	因子组合	参考文献
成人皮肤成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	[17]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[12, 17, 28]
	Oct4, Sox2, Klf4	[15]
新生儿皮肤成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog	[60]
新生儿包皮成纤维细胞	Oct4, Sox2, Nanog, Lin28	[13]
	Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, Klf4, c-Myc	[61]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	[17]
胎儿肺成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[32, 60]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog	[32]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[17, 31]
	Oct4, Sox2, Nanog, Lin28	[13]
	Oct4, Sox2, Klf4	[31]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, SV40 large T	[62]
	Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, SV40 large T	
	Oct4, Sox2, Nanog, SV40 large T	
	Oct4, Sox2, SV40 large T	
	Oct4, SV40 large T	
人 ES 细胞来源的成纤维细胞	Oct4, Sox2, c-Myc, SV40 large T	
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	[17]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	
	Oct4, Sox2, Klf4	
成纤维状滑膜细胞	Oct4, Sox2, c-Myc	
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[12]
具有间质表型的体细胞	Oct4, Sox2, Nanog, Lin28	[13]
骨髓间质细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[29]
间充质干细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 large T	[17]
人包皮来源的幼年角质形成细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[38]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog	[32]
成人角质形成细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	[38]

Table 4 A combined genetic and chemical approach for generating iPS cells from mouse and human somatic cells**表 4 联合运用遗传的和化学的方法将小鼠和人的体细胞重编程为 iPS 细胞**

鼠或人的体细胞	因子组合(遗传方法)	小分子化合物	参考文献
小鼠胚胎成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	Wnt3a-CM	[26]
	Oct4, Sox2, Klf4	Wnt3a-CM	[26]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	VPA	[24]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	TSA	[24]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	5-AZA	[23, 24]
	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	5-AZA + Dex	[24]
	Oct4, Sox2, Klf4	VPA	[24]
	Oct4, Klf4	BIX + Bay	[40]
鼠成熟 B 淋巴细胞	Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc	5-AZA	[23]
鼠神经干细胞	Oct4, Klf4	PD0325901 + CHIR99021	[39]
	Oct4, Klf4	BIX	[20]
人包皮成纤维细胞	Oct4, Sox2, Klf4	VPA	[37]
人皮肤成纤维细胞			

Wnt3a-CM: 含 Wnt3a 的条件培养基; VPA: 丙戊酸(valproic acid); TSA: 曲古抑菌素 A(Trichostatin A); 5-AZA: 5- 氮杂胞苷(5-aza-cytidine); BIX: BIX-01294; Bay: 钙通道激动剂 BayK8644; Dex: 地塞米松(Dexamethasone).

体细胞重编程为 iPS 细胞所需转录因子组合需根据体细胞种类及其相应转录因子表达水平或额外加入的小分子化合物加以灵活选择(表 2、表 3 和表 4)。一般, Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4 组合或 Oct4、Sox2、Klf4 组合即可将体细胞重编程为 iPS 细胞, 只是后一种组合重编程的效率较前一种低许多(表 2、表 3 和表 4)。当选用小分子化合物时, 可大幅度提高重编程效率和 / 或减少转录因子使用个数^[20, 23, 24, 26, 37, 39, 40], 增加转录因子使用个数(Oct4、Sox2、Nanog、Lin28、c-Myc 和 Klf4), 也可大幅度提高重编程效率^[61]。又如 Oct4 和 Klf4 2 种基因, 甚至只用 Oct4 一个基因, 即可将神经干细胞或前体细胞转化成 iPS 细胞, 这主要由于这些细胞本身高表达 Sox2、c-Myc 和 Klf4^[20, 22, 39, 59], 而当在培养液中加入小分子化合物 BIX 或 PD0325901 与 CHIR99021, 则可显著提高重编程效率^[20, 39]。Oct4 和 Klf4 2 种因子与小分子化合物 BIX 和 Bay 组合联用时, 可高效率将小鼠成纤维细胞诱导为 iPS 细胞, 这时 BIX 和 Bay 可以弥补外源 Sox2 的缺失, 这是由于小鼠成纤维细胞重编程为 iPS 细胞至少需要 Oct4、Sox2 和 Klf4 3 种因子^[40]。小鼠成熟 B 细胞需要导入 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 和 C/EBP α 5 种基因才能转化成 iPS 细胞^[19], 而当在培养液中加入 5-AZA, Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 4 种因子亦可将成熟 B 细胞诱导为 iPS 细胞^[23]。

2.2 基因导入方式

目前, 通过逆转录病毒^[11]、慢病毒^[13]、腺病

毒^[34]和转座子^[45, 46]介导的方式均可将转录因子对应的基因导入体细胞, 进而将其重编程为 iPS 细胞。

新近, Hochedlinger 小组和 Yamanaka 小组均通过腺病毒介导的转基因方式将转录因子的基因导入体细胞, 进而瞬时表达这些基因即可获得无病毒载体整合的 iPS 细胞。这两个小组的研究结果表明, 将体细胞重编程为 iPS 细胞只需转录因子基因在体细胞内瞬时表达即可达到目的, 而无需病毒载体整合进宿主细胞基因组中, 但是该方法将体细胞诱导为 iPS 细胞的效率较逆转录病毒和慢病毒的低许多^[14, 35]。非整合方式实现体细胞重编程为 iPS 细胞的理论基础是: 在通过逆转录病毒介导的方式将转录因子基因导入体细胞而获得的 iPS 细胞上检测发现, 转录因子转基因表达水平非常低或外源转基因完全沉默, 而内源性转录因子基因被激活而维持很高表达水平, 这时 iPS 细胞多潜能性靠内源性转录因子表达来维持, 至此, 外源转录因子转基因已完成自己的使命而不表达^[15, 35]。

最初, 每一个逆转录病毒载体或慢病毒载体仅携带一个转录因子基因, 采取如下策略生产病毒和感染细胞。逆转录病毒的生产有两种方案: 一是“直接混合”的方案, 即用含 4 种或更多因子质粒的混合物转染包装细胞, 进而获得携带 4 种或更多因子基因的病毒混合物, 接着用病毒混合物感染细胞; 二是采用“先后分混”的方案, 即先生产携带每一种因子基因的病毒, 然后将收集的病毒上清等比例混合后感染目标细胞。慢病毒生产只能采取

“先分后混”的方案。最近, 成功构建了携带 3 种转录因子基因的腺病毒载体(基因之间由 2A 序列相连)^[35]、携带 4 种转录因子基因的腺病毒载体^[34]和慢病毒载体^[63~65], 这将使病毒生产和感染细胞过程更为简捷。此外, 将 4 种转录因子基因克隆于同一载体中, 亦成功构建了转座子表达载体^[45, 46]。

3 病人或疾病特异性 iPS 细胞的问世

2008 年, Eggan 小组从家族型肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)患者身上提取皮肤细胞, 采用 iPS 细胞技术首次将患者来源的体细胞重编程为“疾病特异的”人 iPS 细胞, 即获得了病人细胞来源的 iPS 细胞, 证实该 iPS 细胞在克隆形态、细胞周期、特异性表面抗原表达、干细胞标志性基因表达和 EBs 形成等方面与人 ES 细胞相似, 并进一步由该 iPS 细胞在体外诱导分化出运动神经元, 而运动神经元是在 ALS 中遭损害的细胞, 这表明将来有可能为患者“量身定做”运动神经元, 进行个性化治疗, 这一做法的最终目标是: 用此类“疾病特异的”iPS 细胞来制备在遗传上相匹配的健康细胞, 并用其取代病变细胞, 但在将这种方法安全地用于人体之前, 仍有许多障碍需要克服^[28]。与此同时, 病患特异性的 iPS 细胞将是研究 ALS 样疾病发生机理和筛选阻止神经元退行药物的重要工具, 在大多数情况下, ALS 是遗传与环境因素间复杂相互作用的结果, 这使得在实验室利用细胞培养来研究这种疾病变得非常困难, 而来自有遗传变异(这些变异使得变异基因携带者容易罹患该疾病)病人的 iPS 细胞则恰好携带着个体病人中与该疾病有关的“众多”遗传信息。无疑这项成果对研究 ALS 是个好消息, 同时也意味着向应用 iPS 细胞来治疗人类疾病的目标又迈出了重要的一步。

2008 年, Daley 小组从一系列遗传性疾病的病人身上获取皮肤成纤维细胞或骨肉瘤起源的间充质细胞, 通过逆转录病毒介导的方式将 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 或 Oct4、Sox2、Klf4 或 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog 转录因子导入上述细胞, 成功获得了一系列“疾病特异的”人 iPS 细胞^[29]。

iPS 细胞技术的问世为建立“个体特异的”、“病人特异的”或“疾病特异的”人 iPS 细胞和实现“个体化的”药物药效与 ADME/Tox 评价等奠定了良好基础。同时, “病人特异的”或“疾病特异的”人 iPS 细胞也可以用来研究特定疾病(如人 ALS)的发病机制。

4 无遗传修饰的 iPS 细胞前景展望

iPS 细胞的未来是发展安全、高效、有临床应用价值的治疗型干细胞, 从安全角度看, 目前的研究正在逐步接近。迄今, 通过逆转录病毒^[11]、慢病毒^[13]和腺病毒介导的方式^[34, 35]均可将转录因子基因导入体细胞而获得 iPS 细胞。逆转录病毒和慢病毒介导的转基因方式使病毒载体整合进宿主基因组, 实现转基因稳定表达, 但这两种转基因方式容易激活致癌基因, 获得的 iPS 细胞可能是有毒害副作用的。Hochedlinger 小组和 Yamanaka 小组先后通过腺病毒将转录因子基因导入体细胞, 瞬时表达这些转录因子而获得了无有害副作用的或无病毒载体整合的 iPS 细胞, 因为这种基因导入方式一般不会使病毒载体整合进宿主基因组中, 有望成为临床应用的比较安全的方法^[34]。当然, 腺病毒载体也有可能整合进基因组中, 尽管这种可能性很小。

以病毒作为载体导入外源基因会使细胞发生遗传修饰, 带有潜在的危险性, 同时该方法操作起来比较麻烦且不实用。上述建立 iPS 细胞的方法均涉及到基因的过量表达(或变化), 那么这些通过遗传修饰的细胞如何恢复基因的常量表达, 此外, 饲养层细胞、小片段载体污染、体外培养细胞的同质性、表观遗传改变和基因组稳定性等都需要加以考虑。腺病毒介导的转基因方式虽然实现用某些因子的短暂性表达代替基因的永久性整合而获得 virus-free adeno-iPS 细胞^[34, 35], 但是该方法仍然不是获得安全、高效、有临床应用价值的治疗型 iPS 细胞的最佳方法。

最理想、最实用的方法是用小分子化合物代替外源基因导入实现体细胞重编程而获得 iPS 细胞, 这一想法在不久的将来有望变为现实。

如图 1 和表 4 所示, 不同转录因子组合与小分子化合物组合联用可极大提高鼠和人体细胞重编程为 iPS 细胞的效率, 这些小分子化合物在促进细胞重编程方面起重要作用。神经干细胞或前体细胞由于其本身高表达 Sox2, 因而 Oct4 和 Klf4 两种因子即可将此类细胞诱导为 iPS 细胞(表 2 和表 4), 而一般需要 3 种因子 Oct4、Sox2、Klf4 才能将小鼠成纤维细胞重编程为 iPS 细胞, 当使用小分子 BIX 与 Bay 组合时, Oct4 和 Klf4 两种因子组合也可高效率将小鼠成纤维细胞诱导为 iPS 细胞^[40], 这时 BIX 与 Bay 组合可以弥补外源 Sox2 的缺失。可见, 转录因子组合和小分子组合联用时, 可减少转

录因子使用个数. 外源 c-Myc 缺失时, Oct4、Sox2、Klf4 组合与 Wnt3a 联用可显著提高小鼠成纤维细胞重编程为 iPS 细胞的效率, 这说明 Wnt 信号通路促进了重编程^[26]. 表 4 所示, 使用抑制剂 PD0325901 和 CHIR99021 分别抑制 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号通路和 GSK3 (glycogen synthase kinase-3) 信号通路, 可提高鼠神经干细胞重编程为 iPS 细胞的效率^[39]. 不难发现, 激活一些信号通路(如 Wnt 通路等)和抑制一些通路(如 MAPK 和 GSK3 通路等)有助于体细胞重编程.

根据细胞命运决定的复杂信号网络, 采用“基于细胞水平的表型筛选法 (cell-based phenotypic assays)”和/或“信号通路筛选法(pathway screens)”, 并辅之以其他高通量的检测或筛选法, 已筛选出特异小分子或天然产物, 他们可以“特异”地促进“特定”干细胞/前体细胞自我更新、存活、增殖或分化, 也可以“特异”将成熟细胞去分化为干细胞/前体细胞等, 这些成绩的取得是建立在人类对主要信号通路有较深入认识基础上的^[66]. 如 TWS119 和二氨基嘧啶化合物(diaminopyrimidine compounds)可分别将小鼠 ES 细胞定向诱导分化为神经细胞^[67]或心肌细胞^[68], 2, 6, 9- 三元取代嘌呤(purmorphamine, hedgehog 信号通路激动剂)可将间充质干细胞定向诱导为成骨细胞^[69, 70], 而 2, 6- 二元取代嘌呤(reversine)则可将骨骼肌细胞去分化为某些前体细胞, 并进一步定向诱导分化为成骨细胞或脂肪细胞等^[71]. 这些功能性的非肽类/肽类的小分子和天然产物具有分子质量小、结构简单、生产成本低、易吸收和生理活性稳定等特点, 在不远的将来, 一些小分子和天然产物有望作为药物用于组织修复与再生等.

以上信息告诉我们, 仅使用小分子化合物即可将体细胞重编程为 iPS 细胞. 但目前, 对体细胞重编程为 iPS 细胞的复杂分子机制仍然知之甚少, 而要达到上述目的, 则要提高人为地操纵体细胞重编程的能力和更好地理解体细胞重编程为 iPS 细胞的调控机制. 任何生命活动均是由遗传调控和表观遗传调控相互作用形成的复杂信号调控网络决定的, 体细胞重编程为 iPS 细胞亦不例外, 只要我们对这一调控网络有一全面认识, 即可发现一些小分子化合物而实现上述目的. Jaenisch 小组和 Hochedlinger 小组为更好地研究体细胞重编程为 iPS 细胞的机制建立了药物可诱导的系统, 该系统是一种新的、可预测的和重复性好的研究平台^[30~33]. 借助该系统有

助于加快阐明体细胞重编程的分子机理和发现更多的小分子化合物, 大为缩短 iPS 细胞从理论研究到临床应用的发展周期.

5 iPS 细胞体内外诱导分化

与人和鼠的 ES 细胞一样, iPS 细胞植于免疫缺陷鼠皮下可在注射部位形成由内、中和外胚层来源细胞杂乱排列构成的畸胎瘤^[11~13, 29]. 将小鼠 iPS 细胞注射入小鼠囊胚, 其可与受体细胞一起发育形成包括生殖系在内的各种组织而形成嵌合体^[11, 22, 24, 34, 39, 52, 53], 同时, 通过嵌合体技术或四倍体胚胎补偿法(tetraploid complementation)亦可获得完全由小鼠 iPS 细胞发育而来的个体^[19, 22, 24, 25, 34, 39, 52, 54].

同样, iPS 细胞在一定培养条件下在体外可分化成含三个胚层来源细胞的多细胞结构, 即 EBs, 在其内可检测到外胚层细胞如 β -III tubulin 阳性神经元、Tuj1 阳性的神经元、Nestin 阳性细胞和星形胶质细胞, 中胚层细胞如 CD34 阳性细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和脂肪细胞, 内胚层细胞如 AFP (alpha-fetoprotein) 阳性细胞以及 TROMA- I 阳性的滋养外胚层细胞等^[11, 12, 15, 22, 32, 37, 38, 62, 72]. 同时, 研究者已成功地将 iPS 细胞在体外定向诱导分化为神经前体细胞^[18]、功能性的成熟神经细胞, 如运动神经元^[28]和多巴胺能神经元^[12, 18, 37, 38]、星形胶质细胞^[18]、造血前体细胞^[14]、造血细胞^[73]、胰腺细胞和肝细胞^[20]、分泌胰岛素的 β 细胞^[74]、心肌细胞^[12, 37, 38, 73, 75~77]、平滑肌细胞^[73, 76, 78]、血管内皮细胞^[73, 76]、胰腺细胞^[37]和耳蜗毛细胞^[79]等.

由 iPS 细胞体外定向诱导分化出的细胞(包括前体细胞)在治疗相应疾病方面均展示出一定疗效. 将由 iPS 细胞在体外诱导分化来的神经前体细胞宫内移植进 13.5 天胎鼠脑中后, 其可在体内进一步分化为胶质细胞和各类神经元(包括谷氨酰胺能神经元、GABA 能神经元和儿茶酚胺能神经元), 这些神经细胞功能性地整合进宿主脑中, 并展现出成熟神经元的活性^[18]. 同时, 将由小鼠 iPS 细胞在体外诱导分化来的多巴胺能神经元移植进帕金森病大鼠模型脑内, 一段时间后可有效缓解大鼠疾病症状和改善其行为^[18]. 此外, iPS 细胞来源的造血前体细胞、内皮前体细胞和成熟内皮细胞及耳蜗毛细胞分别成功用于治疗镰状红细胞贫血^[14]、血友病 A^[40]和治疗神经感觉性听力障碍^[79].

总之, 以上体内外实验充分证明了小鼠和人 iPS 细胞的多向分化潜能. iPS 细胞技术为每个个

体量身定做 iPS 细胞提供了现实的可能性^[28, 29, 80~83], iPS 细胞及其衍生物作为细胞替代治疗的种子细胞已显示出良好应用前景^[14, 18, 79], 而由 iPS 细胞体外定向诱导分化实验所获数据又决定其在临床上的进一步应用。

但是, 必须看到, 由于目前对干细胞(包括 iPS 细胞、ES 细胞和成体干细胞)自我更新与分化等行为的调控机制仍然知之甚少, 迄今人类还不能按照自己的意图将干细胞(包括 iPS 细胞、ES 细胞和成体干细胞)在体外定向诱导分化为任意感兴趣的功能细胞。许多 ES 细胞体外分化模型被建立以获得不同类型终末分化细胞, 但这些模型存在诸多问题: 比如 ES 细胞还不能向单一方向分化或者 ES 细胞还不能按照我们的意图定向分化, 因而诱导分化后获得的往往是混合型细胞, 如何通过准确控制 ES 细胞分化行为和优化诱导分化技术线路以实现 ES 细胞完全定向分化是进一步探讨的科学命题。突破如上理论和技术瓶颈的关键所在, 是利用合适的模型系统阐明决定哺乳动物发育过程中细胞类型特化、组织形成和器官发生等的调控网络。

随着人类对干细胞(包括 iPS 细胞、ES 细胞和成体干细胞)分化调控机制认识的不断加深, 从人 iPS 细胞将会衍生出更多种类的人类细胞, 将为细胞替代治疗、新药筛选与评价及其他用途提供大量的细胞源——种子细胞。

6 前景展望

iPS 细胞研究成果在干细胞和发育生物学研究领域无疑具有里程碑意义, 其在短时间内取得了一系列突破, 可以预见, 有朝一日, iPS 细胞必将应用于临床, 解决人类面临的各种疾患等, 但在获得安全、高效、实用、有临床应用价值的治疗型 iPS 细胞之前, 还面临许多问题、亟待突破的瓶颈和需要深入研究的领域: a. 解析诱导体细胞重编程为 iPS 细胞的分子机制, b. 研究 iPS 细胞生物学特性和行为(如自我复制、增殖和分化等)调控的机制及 iPS 细胞体外定向诱导分化机制, c. 提高 iPS 细胞制备效率, d. 充分评价 iPS 细胞临床应用的安全性, e. 建立高效、安全、实用制备人 iPS 细胞的方法, 即在阐明体细胞重编程为 iPS 细胞机制的基础上建立无遗传修饰的 iPS 细胞制备策略与方法(如仅利用一些小分子物质即将人的细胞重编程为 iPS 细胞), f. 在前一项研究的基础上, 探索一条简便制备“个体特异的”或“疾病特异的”治

疗型人 iPS 细胞的技术路线和方法, 等等。

参 考 文 献

- 徐燕宁, 关娜, 张庆华. 体细胞重编程为多潜能干细胞的研究进展. 生命科学, 2008, **20**(2): 231~236
Xu Y N, Guan N, Zhang Q H. Chin Bull Life Sci, 2008, **20** (2): 231~236
- Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. Curr Opin Biotech, 2007, **18** (5): 467~473
- Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell, 2008, **132**(4): 567~582
- Nishikawa S, Goldstein R A, Nierras C R. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, **9**(9): 725~729
- 夏小雨, 褚建新, 陈学进. 分化细胞经特定因子诱导重编程为多能干细胞. 生物工程学报, 2008, **24**(7): 1121~1127
Xia X Y, Zhu J X, Chen X J. Chin J Biotech, 2008, **24**(7): 1121~1127
- 周一叶, 曾凡一. 体细胞诱导为多能干细胞的最新进展. 生命科学, 2008, **20**(3): 425~430
Zhou Y Y, Zeng F Y. Chin Bull Life Sci, 2008, **20**(3): 425~430
- 李林凤, 关伟军, 马月辉, 等. 体细胞直接转化为多能干细胞的新方法. 生物工程学报, 2008, **24**(10): 1695~1701
Li L F, Guan W J, Ma Y H, *et al.* Chin J Biotech, 2008, **24**(10): 1695~1701
- 房波, 宋后燕. 体细胞重编程为诱导多能干细胞的研究. 生命的化学, 2008, **28**(3): 242~244
Fang B, Song H Y. Chemistry of Life, 2008, **28**(3): 242~244
- 刘爽, 段恩奎. 诱导产生多能性干细胞(iPS 细胞)的研究进展. 科学通报, 2008, **53**(4): 377~385
Liu S, Duan E K. Chin Sci Bull, 2008, **53**(4): 377~385
- 刘国强, 洪天配. 诱导性多潜能干细胞的研究进展和应用前景. 世界华人消化杂志, 2008, **16**(12): 1255~1259
Liu G Q, Hong T P. World Chin J Digest, 2008, **16**(12): 1255~1259
- 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
- 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
- Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 2007, **318** (5858): 1917~1920
- 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
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat Biotech, 2008, **26**(1): 101~106

- 16 Wernig M, Meissner A, Cassady J P, *et al.* c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, **2** (1): 10~12
- 17 Park I H, Zhao R, West J A, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451** (7175): 141~146
- 18 Wernig M, Zhao J P, 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 USA*, 2008, **105**(15): 5856~5861
- 19 Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, **133**(2): 250~264
- 20 Shi Y, Do J T, Despons C, *et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(6): 525~528
- 21 Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, **18**(12): 890~894
- 22 Kim J B, 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
- 23 Mikkelsen T S, Hanna J, Zhang X, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, **454**(7200): 49~55
- 24 Huangfu D, Maehr R, Guo W, *et al.* Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotech*, 2008, **26**(7): 795~797
- 25 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
- 26 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
- 27 Lin S L, Chang D C, Chang-Lin S, *et al.* Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*, 2008, **14** (10): 2115~2124
- 28 Dimos J T, Rodolfa K T, Niakan K K, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, **321**(5893): 1218~1221
- 29 Park I H, Arora N, Huo H, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, **134**(5): 877~886
- 30 Brambrink T, Foreman R, Welstead G G, *et al.* Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(2): 151~159
- 31 Hockemeyer D, Soldner F, Cook E G, *et al.* A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(3): 346~353
- 32 Maherali N, Ahlfeldt T, Rigamonti A, *et al.* A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(3): 340~345
- 33 Stadtfeld M, Maherali N, Breault D T, *et al.* Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(3): 230~240
- 34 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, **322**(5903): 945~949
- 35 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, **322**(5903): 949~953
- 36 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, *et al.* *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 2008, **455** (7213): 627~632
- 37 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotech*, 2008, **26**(11): 1269~1275
- 38 Aasen T, Raya A, Barrero M J, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotech*, 2008, **26**(11): 1276~1284
- 39 Silva J, Barrandon O, Nichols J, *et al.* Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*, 2008, **6** (10): e253
- 40 Shi Y, Despons C, Do J T, *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
- 41 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
- 42 Li W, Wei W, Zhu S, *et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(1): 16~19
- 43 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
- 44 Xu D, Alipio Z, Fink L M, *et al.* Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(3): 808~813
- 45 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
- 46 Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, **458**(7239): 766~770
- 47 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, **136**(5): 964~977
- 48 Tada T. Genetic modification-free reprogramming to induced pluripotent cells: fantasy or reality?. *Cell Stem Cell*, 2008, **3** (2): 121~122
- 49 Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*, 2007, **2** (12): 3081~3089
- 50 Park I H, Lerou P H, Zhao R, *et al.* Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 2008, **3**(7): 1180~1186
- 51 Wernig M, Lengner C J, Hanna J, *et al.* A drug-inducible transgenic

- system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotech*, 2008, **26**(8): 916~924
- 52 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
 - 53 Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotech*, 2007, **25**(10): 1177~1181
 - 54 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, **448**(7151): 313~317
 - 55 Feng B, Jiang J, Kraus P, *et al.* Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(2): 197~203
 - 56 Qin D, Gan Y, Shao K, *et al.* Mouse meningeocytes express Sox2 and yield high efficiency of chimeras after nuclear reprogramming with exogenous factors. *J Biol Chem*, 2008, **283**(48): 33730~33735
 - 57 Eminli S, Utikal J S, Arnold K, *et al.* Reprogramming of neural progenitor cells into ips cells in the absence of exogenous sox2 expression. *Stem Cells*, 2008, **26**(10): 2467~2474
 - 58 Duinsbergen D, Eriksson M, 't Hoen P A, *et al.* Induced pluripotency with endogenous and inducible genes. *Exp Cell Res*, 2008, **314**(17): 3255~3263
 - 59 Kim J B, Sebastiano V, Wu G, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, **136**(3): 411~419
 - 60 Lowry W E, Richter L, Yachechko R, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(8): 2883~2888
 - 61 Liao J, Wu Z, Wang Y, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*, 2008, **18**(5): 600~603
 - 62 Mali P, Ye Z, Hommond H H, *et al.* Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*, 2008, **26**(8): 1998~2005
 - 63 Carey B W, Markoulaki S, Hanna J, *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(1): 157~162
 - 64 Shao L, Feng W, Sun Y, *et al.* Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame. *Cell Res*, 2009, **19**(3): 296~306
 - 65 Sommer C A, Stadtfeld M, Murphy G J, *et al.* Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 2009, **27**(3): 543~549
 - 66 Xu Y, Shi Y, Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature*, 2008, **453**(7193): 338~344
 - 67 Ding S, Wu T Y, Brinker A, *et al.* Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(13): 7632~7637
 - 68 Wu X, Ding S, Ding Q, *et al.* Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(6): 1590~1591
 - 69 Wu X, Ding S, Ding Q, *et al.* A small molecule with steogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(49): 14520~14521
 - 70 Wu X, Walker J, Zhang J, *et al.* Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. *Chem Biol*, 2004, **11**(9): 1229~1238
 - 71 Chen S, Zhang Q, Wu X, *et al.* Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**(2): 410~411
 - 72 Di Stefano B, Prigione A, Broccoli V. Efficient genetic reprogramming of unmodified somatic neural progenitors uncovers the essential requirement of Oct4 and Klf4. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(5): 707~716
 - 73 Schenke-Layland K, Rhodes K E, Angelis E, *et al.* Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells*, 2008, **26**(6): 1537~1546
 - 74 Tateishi K, He J, Taranova O, *et al.* Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 2008, **283**(46): 31601~31607
 - 75 Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, *et al.* Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, **118**(5): 507~517
 - 76 Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, *et al.* Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, **118**(5): 498~506
 - 77 Zhang J, Wilson G F, Soerens A G, *et al.* Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, 2009, **104**(4): e30~41
 - 78 Xie C, Huang H, Wei S, *et al.* A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(5): 741~748
 - 79 Beisel K, Hansen L, Soukup G, *et al.* Regenerating cochlear hair cells: quo vadis stem cell. *Cell Tissue Res*, 2008, **333**(3): 373~379
 - 80 Byrne J A. Generation of isogenic pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(R1): R37~41
 - 81 Condit M L, Rao M. Regulatory issues for personalized pluripotent cells. *Stem Cells*, 2008, **26**(11): 2753~2758
 - 82 Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(7): 739~740
 - 83 Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, **1**(1): 39~49

Induced Pluripotent Stem Cells (iPS Cells): Current Status and Future Prospect*

SHEN Hong-Fen^{1,3)**}, YAO Zhi-Fang^{1)**}, XIAO Gao-Fang¹⁾,
JIA Jun-Shuang¹⁾, XIAO Dong^{1,2)***}, YAO Kai-Tai^{1,3)***}

(¹Cancer Research Institute, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China ;

²Institute of Comparative Medicine and Center of Experimental Animals, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

³Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract Over the past 28 months, the induced pluripotent stem cells (iPS cells, with characteristics identical to those of embryonic stem cells (ES cells)) directly *in vitro* reprogrammed from nonembryonic cells and tissues have captured great attentions in both scientific community and general public. Somatic reprogramming, dedifferentiation and the resource of pluripotent stem cells become the research hot points of stem cells and developmental biology. Person-, patient- and disease-specific iPS cells could be very useful in regenerative medicine and drug discovery, etc. iPS cell history, the several key steps in generating iPS cells (including approaches to gene delivery, combined uses of defined factors and small molecules to induce somatic cells into iPS cells, and choice of somatic cell types), patient- and disease-specific iPS cells, *in vivo* and *in vitro* differentiation of iPS cells, and the possibility of genetic modification-free iPS cells were discussed.

Key words somatic cell reprogramming, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells (iPS cells), differentiation, stem cell-based cell therapy, genetic modification-free reprogramming, small molecules

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00794

*This work was supported by grants from The NSFC-Guangdong Province of China (u0732006), The National Natural Science Foundation of China (30271177), The Guangdong Medical Science Foundation of China (A2007359), The Science and Technology Talented Man Foundation of Outstanding Young and Middle-aged People of Southern Medical University, The Special Fund of Scientific Instrument Collaborative Share-net in Guangzhou (2006176) and Guangdong Natural Science Foundation of China(9151063101000015).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

XIAO Dong. Tel: 86-20-62789439, E-mail: Xiao_d@hotmail.com

YAO Kai-Tai. Tel: 86-20-61648225, E-mail: ktyao@fimmu.com

Received: November 18, 2008 Accepted: April 10, 2009