

诱导多潜能干细胞(iPSCs)的研究与应用进展*

付玉华¹⁾ 周秀梅¹⁾ 徐凤青¹⁾ 钱其军^{1, 2)**}

(¹⁾ 浙江理工大学生命科学学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

(²⁾ 中国人民解放军第二军医大学, 东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室, 上海 200433)

摘要 诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)是体细胞在外源因子作用下, 经直接细胞核程序重整而重新获得多潜能的干细胞. iPSCs在疾病的模型建立与机理研究、细胞治疗、药物的发现与评价等方面有着巨大的潜在应用价值. 在过去几年中, 科学家们致力于改进体细胞重编程技术并取得许多突破. 然而, 为实现其在临床上的应用, 必须克服体细胞重编程效率低和 iPSCs 成瘤风险两大挑战, 而且重编程机制有待进一步阐明. 结合 iPSCs 最新研究成果, 评述了有关领域国内外研究进展, 重点讨论当前存在问题, 并展望未来研究方向.

关键词 体细胞重编程, 诱导多潜能干细胞, 疾病模型, 细胞治疗, 小分子

学科分类号 Q813, Q75

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00333

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)是来源于哺乳动物囊胚内细胞团(inner cell mass, ICM)的多潜能干细胞, 具有无限自我更新和多向分化能力. ES 细胞在疾病模型建立与机理研究、细胞治疗、药物发现与评价等方面极具应用价值. 然而, 使用人类胚胎涉及伦理和免疫排斥问题, 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 细胞样多潜能干细胞, 早期途径主要有体细胞核移植、细胞融合和细胞提取物诱导, 但亦因面临伦理、免疫排斥、技术、宗教和法律等问题限制了多潜能干细胞的研究与应用. 而经特定转录因子诱导的体细胞重编程克服了上述障碍, 无疑是获取多潜能干细胞的理想途径之一. 2006 年, 日本 Yamanaka 研究小组^[1]将逆转录病毒介导的 Oct4、Sox2、Klf4 及 c-Myc 4 个基因转入小鼠成纤维细胞, 首次将体细胞直接重编程为 ES 细胞样的多潜能干细胞, 并命名为诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 标志着体细胞重编程为 iPS 细胞技术诞生. 迄今, 大鼠^[2-3]、人^[4-5]、猪^[6-7]、猴^[8]和兔^[9]的 iPS 细胞系皆已建立, 并证实小鼠 iPS 细胞具有 ES 细胞的发育全能性^[10-12]. iPS 细胞在疾病模型建立与机理研究、药物的发现与评价方面已取得重大成果, 并有望用于细胞治疗. 鉴于综述^[13-15]对重编程转录因子、体细胞类型、iPS

细胞的筛选与鉴定已有详细评述, 此不赘述. 本文就近期 iPS 细胞研究所取得的最新进展作一评述, 分析当前存在问题与争议, 以期在整体上把握 iPS 研究和应用方向, 并对未来的研究工作有所帮助.

1 iPS 细胞的发展历程

2006 年 8 月, Yamanaka 研究小组确定最少用 4 种转录因子(Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)将小鼠成纤维细胞重编程为 iPS 细胞^[1]. 2007 年底, Yamanaka 小组^[14]和 Thomson 小组^[15]先后将人成纤维细胞重编程为 iPS 细胞. 从此, iPS 细胞的研究与应用取得突破性进展. 不同类型体细胞主要通过基因导入技术重编程为 iPS 细胞, 导入转录因子个数不断减少、基因载体进一步优化、iPS 细胞的筛选与鉴定技术日趋成熟. 四倍体胚胎补偿法(tetraploid embryo complementation)证实小鼠 iPS 细胞具有发育全能性^[10-12]. 蛋白质转染技术^[16-17]和 mRNA 转染技术^[18]分别成功制备无遗传修饰 iPS 细胞; 化学小分子和天然化合物可提高体细胞重编程

* 国家杰出青年基金资助项目(30925037).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-86843185, E-mail: qianqj@163.com

收稿日期: 2010-06-24, 接受日期: 2010-09-07

效率, 并且功能性替代一些重编程因子^[19-25]. 不同种属动物大鼠^[2-3]、猪^[6-7]、猴^[8]和兔^[9]的 iPS 细胞系和多种疾病或患者疾病特异性的 iPS 细胞系已建立, 并成功应用于疾病模型构建与机理研究^[26-41]及药物发现与评价^[33, 37, 42]. 此外, iPS 细胞在动物镰刀形贫血症(sickle cell anemia, SCA)^[26]、帕金森疾病(Parkinson disease, PD)^[27]和肿瘤^[28]等疾病模型上的成功疗效, 提示 iPS 细胞有望用于人类疾病的临床治疗.

2 基因导入技术重编程体细胞为 iPS 细胞

2.1 转录因子使用原则与影响因素

体细胞重编程为 iPS 细胞所需的转录因子, 与外源因子的诱导水平、内源相应转录因子表达水平、RNA 导入水平、其他因子的过表达或 RNAi 干扰因子表达能力等生物因素有关, 亦与化学物质使用与否、物理刺激和细胞培养条件等非生物因素相关. a. 导入核心转录因子 Oct4 和 Sox2 的情况下, 重编程效率通常与导入的外源因子个数正相关. 肖磊研究组用 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog 和 Lin28 6 个转录因子诱导人成纤维细胞, 获得 10.4 倍于 4 因子(Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)的重编程效率^[43]. 针对癌基因 c-Myc 重新激活导致 iPS 细胞高成瘤性, 证实不导入 c-Myc 能够完成重编程^[44-45], 但重编程效率显著降低. 然而, 最近证实 l-Myc 参与重编程的 iPS 细胞生成效率更高且不成瘤^[46]. 进一步研究表明核内受体 Nr5a2(Lrh-1)^[47]、化学小分子 repsox^[49]可分别弥补外源 Oct4 和 Sox2 的缺失将体细胞重编程为 iPS 细胞, 而在黑色素瘤细胞的重编程中外源 Sox2 是非必需^[48], 这也表明传统的核心重编程因子不是不可替代的. b. 细胞内源高表达重编程因子能减少转录因子使用个数和提高重编程效率. 小鼠和人神经干细胞表达高于 ES 细胞水平的内源 Sox2 和 c-Myc, 研究证实^[49-50]仅导入单个转录因子 Oct4 即可将其重编程为 iPS 细胞. 此外, 脂肪干细胞^[51]和角质细胞^[52]等也具高于 ES 细胞表达水平的内源 Klf4、c-Myc, 这大幅度提高了细胞重编程效率. c. RNA 参与体细胞重编程为 iPS 细胞. 研究表明^[18], 导入转录因子 (Oct4、Sox2、Lin28 和 Naong)相应 mRNA 可将人成纤维细胞重编程为 iPS 细胞. Lin 等^[53]仅用 ES 细胞富含的 miRNA-302 即将人黑色素瘤细胞和前列腺癌细胞重编程为 ES 细胞样多能干细胞. 此外, 导入小鼠 ES 细胞特异性 miR-290 家族的 miR-291-

3p、miR-294 及 miR-295(三者可替代 c-Myc)^[54]或抑制体细胞中 miR-let7 均可提高重编程效率^[55].

d. 除重编程因子 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog 和 Lin28 外, 其他因子(Esrrb^[56]、C/EBP α ^[57]、UTF1^[58]、SV40 LT^[59]和 hTERT^[60])的过表达或被 RNAi 干扰(RNAiPax5^[57]、RNAiP53^[58]、RNAiPax7 和 RNAiDNMT^[61])的下调表达也提高了重编程效率和(或)减少转录因子使用个数. e. 化学物质可提高重编程效率和(或)减少转录因子使用个数(本文第 4 节将具体论述). f. 物理刺激、细胞培养条件等非生物因素影响细胞重编程. 研究表明^[62], 小机械力影响小鼠 ES 细胞分化方向, 并改变单个 ES 细胞 Oct4 表达水平, 然而, 此方法可否激活内源性重编程因子或多潜能性基因促进 iPS 细胞形成亟待研究. 另外, 低 O₂ 浓度的培养条件可提高重编程效率^[63].

2.2 转录因子导入方式

目前, 基因导入技术是制备 iPS 细胞的主要技术, 基因载体的改良推动无遗传修饰 iPS 细胞的建立. 早期使用的病毒载体, 如逆转录病毒载体^[1-5, 7-8]、慢病毒载体^[4, 6-7, 9]、诱导表达的慢病毒载体^[64-65]、单一慢病毒载体^[66-67]及 piggyBac 转座子(iPS 细胞中转基因可被转座酶切除)^[68-69]整合型载体将外源基因序列随机整合到基因组, 存在诱发肿瘤和导致宿主基因表达失调的风险. 研究发现, iPS 细胞中转基因表达水平极低甚至完全沉默, 其自我更新能力和多潜能性靠激活的内源转录因子维持, 表明外源基因只是重编程的启动因素, 无需转基因持续组成性表达, 这亦被非整合型载体介导的 iPS 细胞制备方法所证实. 腺病毒载体^[70]、RNA 病毒^[71-72]、附着体^[73]和质粒^[74-75]等非整合型载体已成功制备 iPS 细胞, 但重编程效率往往较整合型载体低. 而且也存在载体基因污染、转基因表达难以精确调控和引起癌变风险. 因此, 为制备适合于临床应用的安全型 iPS 细胞, 则需要新型载体或对非整合型载体进一步改造, 建立可调控型的基因导入技术. Jia 等^[76]建立非病毒微环状载体携带 Oct4、Sox2、Lin28 和 Naong(reprogramming cassette, 使用 2A 肽段和 IRES, 高效表达 4 个转录因子)诱导脂肪干细胞重编程为 iPS 细胞, 该载体能高效率制备无遗传修饰 iPS 细胞. 最近研究^[77]发现, 仅病毒载体也能重编程体细胞为 iPS 细胞, 这一发现为利用基因导入技术获取 iPS 细胞提供新思路. 此外, 东方肝胆外科医院基因-病毒治疗实验室^[78]已建立

能高效诱导 iPS 细胞的重组腺病毒载体, 该载体能高效调控并介导体细胞重编程为 iPS 细胞。

3 蛋白质转染技术重编程体细胞为 iPS 细胞

为克服当前基因操作风险, 丁胜研究组首次采用蛋白质转染技术制备 iPS 细胞^[16], 添加化学小分子丙戊酸(valproic acid, VPA)情况下, 融合穿膜肽 11R (poly-arginine) 的蛋白质组合 11R-Oct4、11R-Sox2、11R-Klf4、11R-c-Myc 和 11R-Oct4、11R-Sox2、11R-Klf4 2 种组合分别将小鼠成纤维细胞重编程为 iPS 细胞。随后, Kim 研究组^[17]使用融合穿膜肽 9R(poly-arginine)的蛋白质组合 9R-Oct4、9R-Sox2、9R-Klf4、9R-c-Myc 重编程人新生儿成纤维细胞为 iPS 细胞。蛋白质转染技术制备的 iPS 细胞无任何遗传修饰, 避免了基因操作和毒副化学物质带给 iPS 细胞的潜在风险, 提高了临床应用的安全性。目前, 蛋白质转染技术依赖化学小分子^[16]并需多次转染^[17], 重编程效率极低(0.001%^[17]), 限制了其在制备 iPS 细胞上的进一步应用。最近研究^[79]发现, BAF 联合 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 能显著提高重编程效率(4.5%), BAF 是负责染色质构型重塑的核蛋白复合物, 其特定组分 Brg1、Baf155 和 Ini1 蛋白能提高重编程效率, 此外, 研究证实 E-钙黏蛋白的部分结构域可提高重编程效率^[80], 因此, 蛋白质组学方法将为改进 iPS 细胞制备技术提

供新策略。我们在转染 11R-Oct4 蛋白至小鼠神经干细胞的研究发现, 蛋白质高效转染技术存在三个核心问题: a. 如何实现蛋白质从培养基进入细胞浆; b. 怎样避免蛋白质被溶酶体持续俘获; c. 如何保证蛋白质从胞浆正确入核。我们已建立高效双穿膜肽系统, 重编程蛋白被核转运蛋白复合体识别而高效入核的同时, 导入能破坏蛋白质穿膜时形成巨胞饮泡的小肽, 使蛋白质被释放, 避免被溶酶体捕获降解。除利用穿膜肽做蛋白质载体外, 也可通过增加细胞膜通透性或纳米隧道途径使蛋白质进入细胞, 如链球菌溶菌素 O(streptolysin-O, SLO)可增加细胞通透性使 ES 细胞提取物进入 293T 细胞^[81]。此外, 是否仅用酶来催化相关蛋白实现重编程也有待研究。高效型蛋白质转染技术依赖重编程机制的阐明和蛋白质的结构与功能研究, 随着安全、有效提高重编程效率的化学物质的发现, 有望建立高效、安全型蛋白质转染-化学药物诱导技术。

4 化学物质提高重编程效率

体细胞重编程效率低($<0.01\%$ ^[14])且动力学缓慢(2~3 周), 极大制约 iPS 细胞研究与应用。化学物质可以提高重编程效率, 并且能功能性替代某些转录因子^[19-25], 其主要通过影响细胞表观遗传修饰和信号转导通路发挥作用(图 1)。

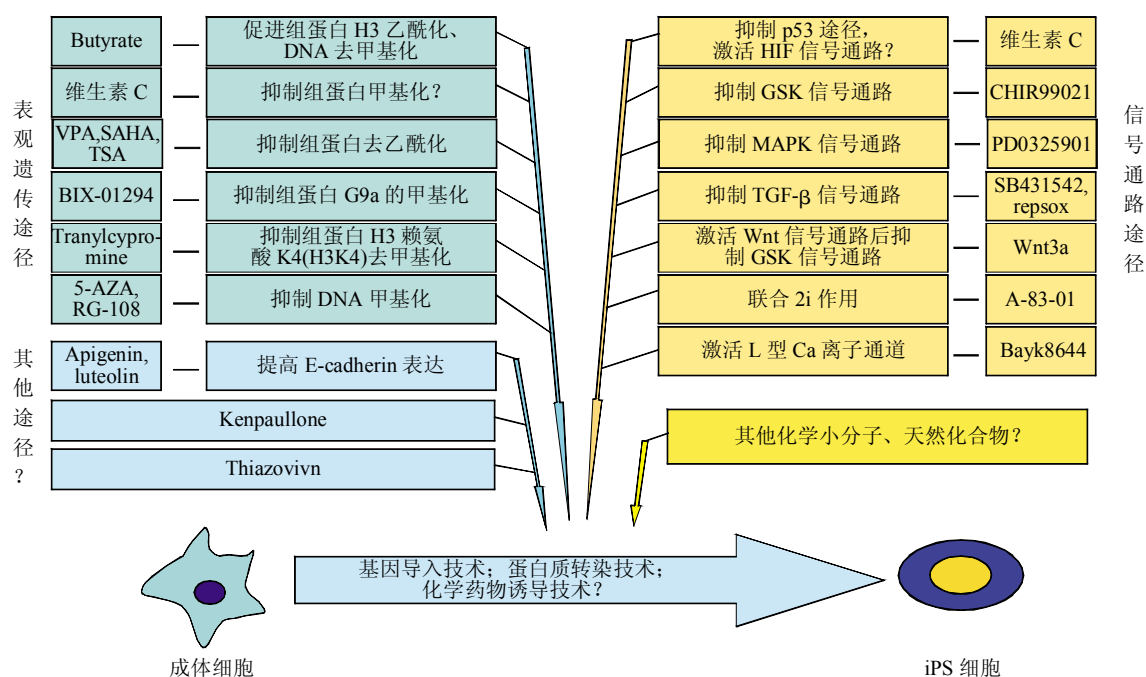


Fig. 1 Chemicals that improve reprogramming efficiency by epigenetic events and particular signaling pathways, etc

图 1 化学物质通过表观遗传和信号通路等途径提高体细胞重编程效率

4.1 表观遗传途径

表观遗传修饰在体细胞重编程过程中有着重要作用, 化学小分子改变体细胞的 DNA 甲基化、组蛋白修饰(乙酰化、甲基化和磷酸化等)等表观遗传特性提高重编程效率。目前, 化学小分子通过表观遗传提高重编程效率已取得一系列进展。a. DNA 甲基转移酶抑制剂 RG-108^[21]、5-氮杂胞苷(5-azacytidine, 5-AZA)^[22, 61]与 G9a 组蛋白甲基化抑制剂 BIX-01294(可替代 Sox2)^[22-23]分别通过降低体细胞 DNA 甲基化水平和组蛋白甲基化水平提高重编程效率。Blau 研究小组证实, 异核体细胞(融合小鼠 ES 细胞核的人成纤维细胞)重编程仅需 1 天时间, iPS 细胞生成率高达 70%^[82]。RNA 干扰实验发现, 异核体重编程依赖诱导性胞嘧啶核苷脱氨酶的激活, 进而结合并催化 Oct4 和 Nanog 启动子区 DNA 去甲基化, 证明去甲基化在重编程中的关键作用。b. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 VPA(可替代 Klf4 和 c-Myc)^[22-23]、曲古抑菌素(trichostatin A, TSA)^[22]、辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)提高组蛋白乙酰化水平而提高重编程效率^[22], 其中 VPA 可提高重编程效率超过 100 倍。最近, Mali 等^[24]研究表明丁酸盐(butyrate, 一种短链脂肪酸)通过提高体细胞的组蛋白 H3 乙酰化和 DNA 去甲基化水平而提高重编程效率 15~51 倍。总之, 化学小分子(或天然化合物)提高重编程效率的研究不仅有助于阐明重编程机制, 也为仅利用化学物质诱导 iPS 细胞奠定基础。

4.2 信号途径

研究表明^[20], 化学小分子可通过调节细胞信号通路提高体细胞重编程效率, 如激活 Wnt 等信号通路和抑制 MEK-ERK1/2、GSK 和 TGF- β 等信号通路均提高重编程效率。Marson 等^[83]在培养基中加入可溶性 Wnt3a, 激活了 Wnt 信号通路而促进 Oct4 和 Sox2 表达, 提高体细胞重编程效率。PD0325901 和 CHIR99021(合称 2i)分别抑制 MEK-ERK1/2 和 GSK 信号通路, 促进 iPS 细胞生长并抑制非 iPS 细胞生长, 因此, 2i 是重编程后期筛选 iPS 细胞的极好小分子^[23, 84]。此外, 2i 联合 A-83-01 提高大鼠肝脏前体细胞重编程效率^[3]。目前, TGF- β 信号通路在重编程中的作用备受关注, 其抑制剂 SB431542 联合 PD0325901 提高重编程效率达 200 倍以上^[85]。Sox2 的替代物 repsox 也通过抑制 TGF- β 信号通路提高重编程效率^[9]。以上研究证实了化学小分子作用于细胞特定信号通路提高重编程

效率的可行性。裴端卿研究组证实维生素 C 可提高小鼠和人体细胞重编程效率达 10%, 维生素 C 可能通过以下作用机制提高重编程效率^[86]: a. 降低细胞 p53 水平而延缓细胞衰老与凋亡, 为其重编程为 iPS 细胞清除衰老障碍; b. 维生素 C 是缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)脯氨酰羟化酶的辅因子, 其可激活 HIF 信号通路提高重编程效率, 这与低 O₂ 提高重编程效率一致^[86]; c. 维生素 C 是组蛋白脱甲基化酶辅助因子, 其可促进组蛋白去甲基化而提高重编程效率。另外, 维生素 C 作为人体必需的水溶性维生素, 这使重编程过程更为安全, 因此, 该成果使安全型 iPS 细胞制备技术的建立又向前迈进一步。

除 4.1 和 4.2 所述两种主要途径外, 化学分子参与重编程多样性途径有待进一步研究, 最近, 裴端卿研究组发现 apigenin 和 luteolin 能上调 E-钙黏蛋白表达而提高重编程效率^[80]。化学小分子具分子质量小、结构简单、易被吸收、生理活性稳定等优点, 其参与重编程不仅减少基因操作风险而且提高重编程效率, 因此, 建立安全型化学药物诱导 iPS 细胞技术势在必行。然而, 仍存在以下问题亟待解决: a. 明晰化学物质参与重编程的详细机制, 如 thiazovivin^[85]、维生素 C^[86]和 kenpaullone^[25]参与重编程的机制尚不完全清楚; b. 控制干细胞自我更新与多能性维持的信号通路错综复杂, 有待筛选更高效的提高重编程效率的化学物质; c. 化学物质的毒性要严格检测并克服其毒副作用, 如 5-AZA 能诱导 DNA 损伤^[87], 确保瞬时的化学处理不影响 iPS 细胞在临床应用; d. 用于重编程的化学药物间有无协同或拮抗作用及作用机制有待研究, 这是建立明确成分的化学药物诱导系统的关键。基于细胞水平的表型筛选法或信号通路法高通量筛选化学小分子和(或)天然化合物, 有望建立安全型化学药物诱导技术。目前, 已初步建立可预测、重复性好的药物可诱导技术平台^[64-65], 筛选用于重编程的化学物质, 最终实现安全型药物诱导技术对体细胞重编程。

5 iPS 细胞的应用进展

随着体细胞重编程为 iPS 细胞的基础研究不断深入, iPS 细胞在疾病模型构建与机理研究、细胞治疗、药物发现与评价的应用中不断取得进展。

5.1 疾病模型构建与机理研究

疾病特异性 iPS 细胞为疾病模型的建立和疾病

机理研究建立新平台, 系列基于 iPS 细胞的动物疾病模型和细胞疾病模型已建立. Hanna 等^[26]首次用小鼠 iPS 细胞建立人 SCA 小鼠模型, 通过基因打靶修正 iPS 细胞疾病基因, 然后诱导分化成造血祖细胞, 移植后可治疗动物的 SCA. Wernig 等^[27]将大鼠 iPS 细胞来源的多巴胺能神经元移植到 PD 大鼠脑内, 可有效改善 PD 模型鼠的症状. 最近, Watarai 等^[28]证实 iPS 细胞分化的天然杀伤 T 细胞(natural killer T cells, NKTs)能显著抵抗小鼠的肿瘤. 此外, 基于 iPS 细胞的血友病 A(hemophilia A, HA)^[29]、脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)^[30]、溶酶体贮积症(lysosomal storage disease, LSD)^[31]、糖尿病(type diabetes, TD) (1 型和 2 型)^[32]和 Rett 综合症(rett syndrome)^[41]动物疾病模型也已建立. 以上研究成果表明可利用 iPS 细胞建立疾病的动物模型以研究疾病发生机制, 并为将来在人体上进行类似治疗提供依据. 然而, 动物疾病模型不能真实反映人类疾病, 动物的遗传背景不能建立人类特定疾病模型. 目前, 基于人 iPS 细胞建立的人 iPS 细胞疾病模型能克服上述局限. 常染色体隐性遗传性疾病脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)与活运动神经元(survival motor neuron, SMN)基因 SMN1 和 SMN2 有关, 实验动物因缺乏 SMN2 基因无法建立有效的 SMA 动物模型, Ebert 等^[33]将 SMA 患者 iPS 细胞分化成有疾病缺陷的神经细胞, 首次在体外成功地再现神经元变性坏死过程. Dimos 等^[34]将 82 岁和 89 岁女性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)患者皮肤细胞重编程为 iPS 细胞, 诱导分化为疾病缺陷的运动神经元, 可直接用于研究 ALS 发生机制和筛选治疗药物, 而其诱导分化的健康运动神经元可用于移植治疗. 最近 Vergara 等^[35]建立基于人 iPS 细胞的豹皮综合症(LEOPARD syndrome)、人 1 型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)^[36]、家族性植物神经功能障碍症(familial dysautonomia, FD)^[37]、骨髓增生性疾病(myeloproliferative disorders, MPD)^[39]和范克尼贫血症(fanconi anaemia, FA)^[40]模型; Daley 小组成功建立系列难治疾病人 iPS 细胞^[38], 包括亨廷顿病(huntington disease, HD)、唐氏综合症 - 三染色体 21(down syndrome-trisomy 21)等. 疾病特异性的 iPS 细胞为研究疾病的发生机理和寻找治疗新措施提供广阔前景.

建立人 iPS 细胞疾病模型的基本步骤: 首先, 建立疾病特异 iPS 细胞系. 重编程的理想供体细胞

应是取材安全、方便的细胞, 如人外周血 T 细胞^[72, 88-89]、脂肪干细胞^[51]和角质细胞^[52]. 供体细胞的选择还需结合疾病类型和其来源 iPS 细胞特性. 例如, Ye 等^[39]将 MPD 患者来源 CD34⁺ 血细胞重编程为疾病特异 JAK2-V617F 突变型的 iPS 细胞系. 而对于 SMA, 与疾病相关只有运动神经元细胞, 但与 SMA 相关的突变基因存在所有细胞, 因此, 供体细胞可来源于取材方便的患者组织. 最近研究表明^[90-91]不同体细胞来源的低代数 iPS 细胞保留其供体细胞某些印记与功能, 而且 iPS 细胞间有转录、表观遗传和分化能力的差异性, 但差异随着 iPS 细胞长期培养而逐渐减少, iPS 细胞更接近 ES 细胞, 因此, 有必要评价不同体细胞来源的 iPS 细胞差异性对疾病模型的安全性、有效性的影响. 其次, iPS 细胞体外分化成与疾病直接相关的细胞系或成熟功能细胞. 多数疾病的表型仅在分化细胞中出现, 然而, FD^[37]和 SMA^[33]的致病基因在其 iPS 细胞中表现, 因此, 可从 iPS 细胞系中研究疾病机理. 总之, 基于 iPS 细胞的疾病的模型建立与机理研究已取得系列进展, 但 iPS 细胞定向分化成复杂疾病相关细胞和研究多重细胞表型疾病机制仍是挑战.

5.2 细胞治疗

患者特异 iPS 细胞是个性化细胞治疗供体的理想来源, 应用 iPS 细胞治疗疾病是人们追求的目标. 理论上, 任何遗传性疾病(SCA、HA 和 SMA 等)和退行性疾病(ALS、PD 和 TD 等)都可移植患者特异 iPS 细胞定向分化的健康细胞来持续治疗. 新近, 三组科学家^[72, 88-89]将人外周血富含的 T 细胞重编程为 iPS 细胞, 外周血 T 细胞是较易获取的重编程供体细胞, 其来源的无遗传修饰 iPS 细胞有望早日用于临床. 目前, 人 iPS 细胞诱导分化出运动神经元^[33-34, 37]、胰岛 β 细胞^[36]等多种功能细胞、前体细胞, 动物 iPS 细胞分化的功能细胞已成功治疗其 SCA^[26]、PD^[27]和肿瘤^[28]等疾病, 预示人 iPS 细胞在细胞治疗的广阔前景. Raya 等^[40]将 FA 患者成纤维细胞纠正基因缺陷后重编程为 iPS 细胞, 然后诱导分化成表型正常的髓系和红细胞系的造血祖细胞, 进一步证明 iPS 细胞在临床上的应用价值. 最近, Tsuji 等^[30]建立安全型小鼠 iPS 细胞, 其来源的神经球植入 SCI 小鼠脑脊髓内能分化为正常生理功能神经元和胶质细胞, 促进神经元轴突再生和恢复 SCI 鼠运动功能, 而非安全型 iPS 细胞既成瘤也不能长期恢复 SCI 鼠运动功能, 这一研究表明可以筛

选安全型 iPS 细胞用于临床. 此外, iPS 细胞更成为组织、器官移植供体的理想来源, 使胰岛、肝脏和肾脏等自体移植成为现实. 迄今, iPS 细胞还没实现真正临床应用, 人 ES 细胞已进行临床实验^[92], 有理由相信 iPS 细胞走向临床为期不远.

iPS 细胞是基因治疗的理想载体^[40], 而且 iPS 细胞比体细胞更易于靶向遗传操作, iPS 细胞在人类单基因遗传病 SCA^[26]、血友病 A^[29]模型中的治疗疗效表明其有望在人类单基因甚至多基因遗传病建模、临床治疗上应用. 锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)介导的对 iPS 细胞的基因打靶取得突破^[93-94], ZFN 具有强大的基因定点修饰功能, 其可高效修正 iPS 细胞的基因缺陷, 而且, 最近人基态 iPS 细胞“mES-like” iPSCs(具高克隆率、克隆呈巢状、XaXa 等小鼠 ES 细胞特征)的研究更有助于对其遗传操作^[95]. iPS 细胞做基因治疗载体有望克服传统基因治疗靶向性差、可控性差的不足. 此外, iPS 细胞能用于高通量筛选治疗基因的安全插入位点, 克服基因插入突变对基因治疗的限制.

5.3 药物发现与评价

目前, 药物发现和评价主要通过实验动物或癌细胞系进行, 难以准确预测药物的靶点、疗效及疾病病理, 人 iPS 细胞及其在体外定向分化的功能细胞可用于高通量筛选新药物, 并在细胞水平为新药药理、药代、药效、毒理等研究提供新策略. Lee 等^[37]首次用 FD 患者 iPS 细胞分化的疾病相关细胞测试药物疗效, 检视到 IKAP 蛋白在病变神经细胞含量比正常神经细胞低, 并评价 FD 候选药物激动素 Kinetin 的效果, 为激动素用于 FD 的长期治疗提供依据. SMA 患者的 iPS 细胞分化保持该疾病表型的运动神经元, 并证实这些神经元对能提高 SMN 蛋白水平的药物 VPA、tobramycin 有反应^[33]. 此外, Nakao 等^[42]用小鼠 iPS 细胞对新型药物 Azumamides 的抗血管生成活性评价, 观察到该药能抑制 iPS 来源的体外血管组织模型的血管化, 为肿瘤治疗提供依据. 因此, iPS 细胞能够用来筛选药物靶点和靶向药物. 在治疗上, 患者特异 iPS 细胞分化的功能细胞可对其所服药物的效果进行实时监测, 这为个性化药物筛选和药效研究提供广阔平台. iPS 细胞是个体化 ES 细胞, 理论上它可揭示干扰胎儿发育和引起出生缺陷的药物, 探讨药物、遗传、环境因素在复杂疾病发生、发展与治疗过程中的相互作用, 有助于疾病的早期干预与诊治. 毋庸置疑, iPS 细胞为药物筛选和评价提供更

安全、有效的理想模型, 必将推动新药开发、药物筛选、药物疗效的研究.

6 存在问题

6.1 重编程效率低

重编程效率低是 iPS 细胞研究与应用必须跨越的一大障碍. 研究者早期一度倾向于 iPS 细胞仅来源于前体细胞和组织干细胞. 然而, 普遍研究表明, 体细胞重编程为 iPS 细胞不受其类型、分化阶段限制, 但不同体细胞的重编程的难易程度存在差异性, 如成熟 B 淋巴细胞比前体 β 细胞较难重编程, 需额外过表达 C/EBP α 或特异性敲除 Pax5^[57], 而且不同体细胞来源的低代数 iPS 细胞也存在显著差异性^[90-91]. 目前, 虽然围绕提高重编程效率的研究已取得系列成果(详见本文第 2 节论述), 但对重编程过程中遗传调控、表观遗传调控和信号转导等机制缺乏深入了解是效率低的主要原因. 因此, 提高重编程效率的关键是重编程分子机制研究. 最近, 裴端卿研究组^[96]和 Tehrani 等^[97]研究表明, iPS 细胞生成是经历间充质-上皮细胞转变(mesenchymal-to-epithelial transition, MET)的多阶段过程, MET 是启动 iPS 细胞生成的关键事件, 并揭示 BMP 通过 BMP-miRNA-MET 枢纽在 MET 的重要作用, 这些具体机制的研究为高效重编程奠定理论基础. 此外, 提高重编程效率要与 iPS 细胞安全性兼顾, 如抑制 p53 基因能够提高重编程效率^[58, 98-102], 但因 p53 具有抑癌作用, p53 抑制型 iPS 细胞存在更大成瘤风险. 目前, 可调控基因诱导技术正逐步建立, 蛋白质转染技术也已实现, 化学小分子和天然化合物参与重编程的研究有望建立安全型化学药物诱导技术, 随着重编程机制的阐明, 有望根据研究与应用需要建立单个或混合系统安全高效获取 iPS 细胞.

6.2 安全性

iPS 细胞与 ES 细胞相似性与差异性并存, 其避开 ES 细胞研究与应用伦理、免疫排斥局限. 目前, 虽已制备无遗传修饰的 iPS 细胞, 但存在诸多安全性问题. a. iPS 与 ES 细胞基因表达虽很相似^[103], 但 iPS 细胞存在遗传缺陷. 最近在小鼠中研究发现, 位于第 12 号染色体的印记基因簇 Dlk1-Dio3 在大部分 iPS 细胞系中不表达, 这些沉默 Dlk1-Dio3 表型的 iPS 细胞系的二倍体嵌合率低, 且不能产生 iPS 细胞来源小鼠^[104]. b. iPS 细胞的成瘤性, 不同体细胞来源的 iPS 细胞成瘤性有

差异^[105-106]. Yamanaka 等研究多种成纤维细胞、胃细胞和肝细胞来源的 iPS 细胞发现胃细胞来源的 iPS 细胞成瘤率为零, 而尾巴尖成纤维细胞来源的 iPS 细胞成瘤率最高(89%)^[106]. 因此, 应选择适当的供体细胞或筛选安全型 iPS 细胞^[30]克服 iPS 细胞临床治疗的成瘤性. c. iPS 细胞及其体外诱导分化细胞的异质性. 体细胞重编程不充分(partially reprogrammed iPSCs)^[61]、筛选标准不严^[1]和 iPS 细胞携带供体细胞的表观遗传记忆^[90-91, 107]和 iPS 细胞分化不定向都导致细胞异质性, 异质性是导致 iPS 细胞成瘤的潜在因素. 目前, Hotta 等^[41]建立人 iPS 细胞新型筛选系统, 将 ES 细胞特异性的早期转座子(ETn)启动子、Oct4 和 Sox2 增强子(EOS)整合进慢病毒载体, 特异地筛选均质性 iPS 细胞, 克服报告基因 Fbx15^[1]、Nanog 或 Oct4 激活的药物抗性筛选及形态学筛选^[108]等方法缺陷. d. iPS 细胞体外定向分化细胞的功能与行为研究尚少, 尤其在细胞治疗上, 目的细胞是否会在治疗靶位或迁移到非靶位点成瘤, 或异位形成组织等是亟待阐明的问题. 图 2 示基于 iPS 细胞的产品在细胞治疗上的风险性评估.

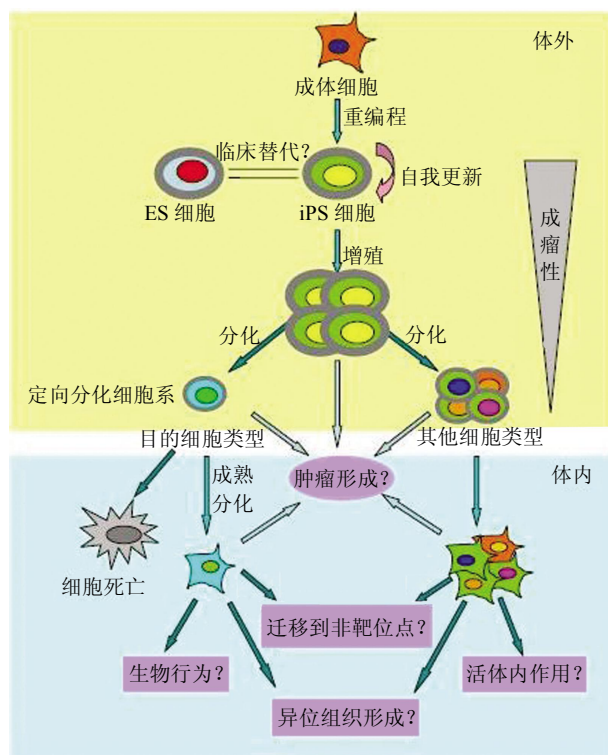


Fig. 2 Risk assessment of induced pluripotent stem cell-based products (adapted from reference[109])

图 2 基于 iPS 细胞的产品风险性分析(修改自文献[109])

除存在上述 6.1 和 6.2 两方面主要问题外, iPS 细胞研究备受争议. a. 理论上, iPS 细胞应满足 ES 细胞“金标准”: 多胚层分化能力、畸胎瘤形成、嵌合动物与生殖系传代(仅限动物), 但不必是其安全应用的“金标准”^[110]. 畸胎瘤形成是人 iPS 细胞最严谨鉴定标准, 但具多向分化潜能的非成瘤型 iPS 细胞更具临床应用价值, 分化能力是 iPS 细胞应用的首要功能性标准. b. 猪、猴和兔的 ES 细胞系未建立而 iPS 细胞系^[6-9]建立, 没有它们的生殖系传代报道, 因此, 它们是否具 ES 细胞的发育全能性有待研究, 但其 iPS 细胞可用于建立疾病模型与疾病机理研究. c. iPS 细胞和 ES 细胞的分子与功能水平差异. 如在功能上, 人 iPS 细胞向神经上皮细胞、功能神经元和神经胶质细胞分化的效率与忠实性比 ES 细胞低, 即使是无遗传修饰的 iPS 细胞^[111]. d. iPS 细胞技术面临体细胞间直接重编程技术优势的挑战, 小鼠胰腺细胞^[112]直接高效重编程为 β 胰岛细胞和皮肤成纤维细胞直接重编程为神经细胞^[113]、心肌细胞^[114]而不经多潜能干细胞过程. 因此, iPS 细胞是否是理想的多潜能干细胞有待研究.

7 结 语

iPS 细胞已成为当前最热门研究领域, 从裴端卿研究组^[108]在国内首先制备出小鼠 iPS 细胞以来, 我国科学家在 iPS 细胞研究领域取得具世界影响力的显著成果. a. 首次建立模式动物大鼠(肖磊研究组^[2])、猴(邓宏魁研究组^[8])与猪(肖磊研究组^[9]和裴端卿研究组^[7])的 iPS 细胞系. 它们在人类疾病研究上有重大应用价值, 适合建立人类疾病动物模型和进行细胞治疗实验. b. 首次证明小鼠 iPS 细胞具有发育全能性. 高绍荣研究组^[12]和周琪研究组^[10]用四倍体胚胎补偿法分别证实小鼠 iPS 细胞能产生足孕小鼠、具生育能力小鼠, 在世界首次证明小鼠 iPS 细胞发育全能性. c. 体细胞重编程为 iPS 细胞机制的阐释和技术的优化. 最近, 裴端卿研究组报道体细胞重编程为 iPS 细胞的一些机制^[96], 该研究组还发现维生素 C 显著提高重编程效率^[86]; 金颖研究组^[115]利用人成纤维细胞作为滋养层细胞, 不添加白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)可诱导神经前体细胞重编程为 iPS 细胞, 该研究组还高效制备出人羊水来源的 iPS 细胞^[116]; 李凌松研究组用转录因子 Oct4、Sox2 和 Nanog 重编程人胎儿肠系膜细胞为 iPS 细胞^[117]; 邓宏魁研究组证实

UTF1 过表达和 RNAi p53 均可提高重编程效率^[58], 裴刚研究组发现小分子 apigenin 和 luteolin 提高重编程效率^[80]. d. 疾病特异性 iPS 细胞系的建立和 iPS 细胞的体外定向分化. 高绍荣研究组成功构建出 β 型地中海贫血症(β -thalassemia anemia)特异性 iPS 细胞系^[118]; 邓宏魁研究组成功将人 iPS 细胞分化成肝细胞和能分泌胰岛素的成熟胰岛细胞^[119-120].

目前, 我们实验室正在进行脂肪干细胞与神经干细胞的诱导重编程, 通过高效诱导 iPS 细胞的重组腺病毒载体^[78]和建立的蛋白质转染技术, 期望建立有临床应用价值的安全型 iPS 细胞库. 综上所述, iPS 细胞的进一步研究与应用, 我们应从以下几个方面努力: a. 阐明体细胞重编程的分子机理, 建立可调控基因诱导、高效型蛋白质转染和安全型药物诱导技术获取 iPS 细胞, 并建立安全、高效、重复性好的 iPS 细胞在体外定向诱导分化新技术与策略; b. 系统比较不同来源人 ES 细胞和不同体细胞来源、不同技术制备的 iPS 细胞多潜能性, 探明 iPS 细胞是否可替代 ES 细胞在临床上应用, 尝试建立符合临床应用的通用标准; c. 研究 iPS 细胞在疾病模型构建与机理研究、细胞治疗、药物发现与评价三大方面应用, 并用 iPS 细胞试验模型研究发育与生殖、基因表达调控、蛋白质互作等; d. 通过对 iPS 细胞基因的靶向操作, 探索其在人类基因治疗和基因敲除(或敲入)动物构建及转基因动物上的应用. 可以设想, 随着重编程机制阐明, 重编程效率的提高和 iPS 细胞应用的安全性增强, 必将实现 iPS 细胞在临床应用这一目标.

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] 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
- [3] 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
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Wu Z, Chen J, Ren J, *et al.* Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, **1**(1): 46-54
- [7] Esteban Ma, Xu J, Yang J, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cell lines from tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, **284**(26): 17634-17640
- [8] 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
- [9] Honda A, Hirose M, Hatori M, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. *J Biol Chem*, 2010, **285**(41): 31362-31369
- [10] Zhao X, Li W, Lv Z, *et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, **461**(7260): 86-90
- [11] Boland M J, Hazen J L, Nazor K L, *et al.* Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, **461**(7260): 91-94
- [12] Kang L, Wang J, Zhang Y, *et al.* iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(2): 135-138
- [13] 申红芬, 姚志芳, 肖高芳, 等. 诱导性多潜能干细胞(iPS cells): 现状及前景展望. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **36**(8): 950-960
Shen H F, Yao Z F, Jia J S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **36**(8): 950-960
- [14] 陈凌懿, 刘 林. 诱导性多潜能干细胞(iPS)的研究现状和展望. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, **39**(7): 621-635
Chen L Y, Liu L. *Sci China C Life Sci*, 2009, **39**(7): 621-635
- [15] 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. *Chinese Science Bulletin*, 2008, **53**(4): 377-385
- [16] Zhou H, Wu S, Joo J Y, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(5): 381-384
- [17] Kim D, Kim C, Moon J, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(6): 472-476
- [18] Yakubov E, Rechavi G, Rozenblatt S, *et al.* Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **394**(1): 189-193
- [19] Ichida J K, Blanchard J, Lam K, *et al.* A Small-molecule inhibitor of Tgf- β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(5): 491-503
- [20] Feng B, Ng J, Heng J D, *et al.* Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(4): 301-312
- [21] 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
- [22] 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
- [23] 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
- [24] Mali P, Chou B, Yen J, *et al.* Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells*, 2010, **28**(4): 713–720
- [25] Lyssiotis Ca, Foreman R K, Staerk J, *et al.* Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(22): 8912–8917
- [26] 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
- [27] 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
- [28] Watarai H, Fujii S, Yamada D, *et al.* Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest*, 2010, **120**(7): 2610–2618
- [29] 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
- [30] Tsuji O, Miura K, Okada Y, *et al.* Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(28): 12704–12709
- [31] Meng X, Shen J, Kawagoe S, *et al.* Induced pluripotent stem cells derived from mouse models of lysosomal storage disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(17): 7886–7891
- [32] Alipio Z, Liao W, Roemer E J, *et al.* Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced pluripotent stem (iPS) derived pancreatic β -like cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(30): 13426–13431
- [33] Ebert A D, Yu J, Rose F F, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, **457**(7227): 277–280
- [34] 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
- [35] Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza S L, *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature*, 2010, **465**(7299): 808–812
- [36] Maehr R, Chen S, Snitow M, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(37): 15768–15773
- [37] Lee G, Papapetrou E P, Kim H, *et al.* Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 2009, **461**(7262): 402–406
- [38] Park I, Arora N, Huo H, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, **134**(5): 877–886
- [39] Ye Z, Zhan H, Dowey S, *et al.* Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood*, 2009, **114**(27): 5473–5480
- [40] Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, **460**(7251): 53–59
- [41] Hotta A, Cheung A Y, Farra N, *et al.* Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods*, 2009, **6**(5): 370–376
- [42] Nakao Y, Narazaki G, Hoshino T, *et al.* Evaluation of antiangiogenic activity of azumamides by the *in vitro* vascular organization model using mouse induced pluripotent stem (iPS) cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(9): 2982–2984
- [43] 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
- [44] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(1): 101–106
- [45] 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
- [46] Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, *et al.* Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(6): 1–6
- [47] Heng J D, Feng B, Han J, *et al.* The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **6**(2): 167–174
- [48] 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 Cell Sci*, 2009, **122**(19): 3502–3510
- [49] Kim J B, Sebastiano V, Wu G, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, **136**(3): 411–419
- [50] Kim J B, Greber B, Araújo M J, *et al.* Direct reprogramming of human neural stem cells by Oct4. *Nature*, 2009, **461**(7264): 649–653
- [51] Sun N, Panetta N J, Gupta D M, *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(37): 15720–15725
- [52] Aasen T, Raya A, Barrero M J, *et al.* Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 2008, **26**(11): 1276–1284
- [53] Lin S, 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
- [54] Judson R L, Babiarz J E, Venere M, *et al.* Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**(5): 459–461
- [55] Melton C, Judson R L, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 2010, **463**(7281): 621–626
- [56] 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
- [57] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, **133**(2): 250–264
- [58] Zhao Y, Yin X, Qin H, *et al.* Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 2008, **3**(5): 475–479
- [59] 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
- [60] Park I, Zhao R, West Ja, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451**(7175): 141–146
- [61] Mikkelsen T S, Hanna J, Zhang X, *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, **454**(7200): 49–55
- [62] Chowdhury F, Na S, Li D, *et al.* Material properties of the cell dictate stress-induced spreading and differentiation in embryonic stem cells. *Nat Mater*, 2009, **9**(1): 82–88
- [63] Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, *et al.* Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(3): 237–241
- [64] Maherali N, Ahfeldt 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
- [65] 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
- [66] Sommer Ca, Stadtfeld M, Murphy G J, *et al.* iPS cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 2009, **27**(3): 543–549
- [67] 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
- [68] 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
- [69] Woltjen K, Michael I P, Mohseni P, *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, **458**(7239): 766–770
- [70] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, **322**(5903): 945–949
- [71] 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. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009, **85**(8): 348–362
- [72] Seki T, Yuasa S, Oda M, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(1): 11–14
- [73] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, **324**(5928): 797–801
- [74] Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, *et al.* Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(22): 8918–8922
- [75] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, *et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, **322**(5903): 949–953
- [76] Jia F, Wilson K D, Sun N, *et al.* A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods*, **7**(3): 197–199
- [77] Dolgin E. Stem cells made without new genes. *Nature*, 2010, **465**(7301): 957–957
<http://www.nature.com/news/2010/100621/full/news>
- [78] 钱其军, 周向军, 张琪, 等. 一种高效诱导多能性干细胞的重组腺病毒载体、使用该载体的诱导方法及其用途. 中国, ZL200910045714.3, 2010-08-04
Qian Q J, Zhou X J, Zhang Q, *et al.* The method and the use of adenovirus vector in inducing pluripotent stem cells in an efficient manner. China, ZL200910045714.3, 2010-08-04
- [79] Singhal N, Graumann J, Wu G, *et al.* Chromatin-remodeling components of the BAF complex facilitate reprogramming. *Cell*, 2010, **141**(6): 943–955
- [80] Chen T, Yuan D, Wei B, *et al.* E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells*, 2010, **28**(8): 1315–1325
- [81] Bru T, Clarke C, McGrew M J, *et al.* Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res*, 2008, **314**(14): 2634–2642
- [82] Bhutani N, Brady J J, Damian M, *et al.* Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 2009, **463**(7284): 1042–1047
- [83] 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
- [84] Silva J, Barrandon O, Nichols J, *et al.* Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*, 2008, **6**(10): e253
- [85] Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods*, 2009, **6**(11): 805–808
- [86] Esteban M A, Wang T, Qin B, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **6**(1): 71–79
- [87] Palii S S, Van Emburgh B O, Sankpal U T, *et al.* DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*, 2008, **28**(2): 752–771
- [88] Staerk J, Dawlaty M M, Gao Q, *et al.* Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(1): 20–24
- [89] Brown M E, Rondon E, Rajesh D, *et al.* Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood T lymphocytes.

- PLoS Biol, 2010, **5**(6) : e11373
- [90] Polo J M, Liu S, Figueroa M E, *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(8): 848–855
- [91] Kim K, Doi A, Wen B, *et al.* Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, **467**(7313): 285–290
- [92] Couzin J. Celebration and concern over U.S. trial of embryonic stem cells. *Science*, 2009, **323**(5914): 568–568
- [93] Zou J, Maeder M L, Mali P, *et al.* Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(1): 97–110
- [94] Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, *et al.* Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**(9): 851–857
- [95] Kerr C L, Cheng L. Multiple, Interconvertible states of human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **6**(6): 497–499
- [96] 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
- [97] Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(1): 64–77
- [98] Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 2009, **460**(7259): 1132–1135
- [99] Li H, Collado M, Villasante A, *et al.* The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, 2009, **460**(7259): 1136–1139
- [100] Kawamura T, Suzuki J, Wang Y V, *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 2009, **460**(7259): 1140–1144
- [101] Utikal J, Polo J M, Stadtfeld M, *et al.* Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, 2009, **460**(7259): 1145–1148
- [102] Marion R M, Strati K, Li H, *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 2009, **460**(7259): 1149–1153
- [103] Guenther M G, Frampton G M, Soldner F, *et al.* Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, **7**(2): 249–257
- [104] Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, **465**(7295): 175–181
- [105] 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
- [106] Miura K, Okada Y, Aoi T, *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 2009, **27**(8): 743–745
- [107] Ghosh Z, Wilson K D, Wu Y, *et al.* Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One*, 2010, **5**(2): e8975
- [108] Qin D, Li W, Zhang J, *et al.* Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. *Cell Res*, 2007, **17**(11): 959–962
- [109] Fink D W. FDA regulation of stem cell-based products. *Science*, 2009, **324**(5935): 1662–1163
- [110] Ellis J, Bruneau B G, Keller G, *et al.* Alternative induced pluripotent stem cell characterization criteria for *in vitro* applications. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(3): 198–199
- [111] Hu B, Weick J P, Yu J, *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(9): 4335–4340
- [112] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, *et al.* *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 2008, **455** (7213): 627–632
- [113] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang Z P, *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 2010, **463**(7284): 1035–1041
- [114] Ieda M, Fu J, Delgado-Olguin P, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010, **142**(3): 375–386
- [115] Li C, Yu H, Ma Y, *et al.* Germline-competent mouse-induced pluripotent stem cell lines generated on human fibroblasts without exogenous leukemia inhibitory factor. *PLoS Biol*, 2009, **4**(8): e6724
- [116] Li C, Zhou J, Shi G, *et al.* Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum Mol Genet*, 2009, **18**(22): 4340–4349
- [117] Li Y, Zhao H, Lan F, *et al.* Generation of human-induced pluripotent stem cells from gut mesentery-derived cells by ectopic expression of Oct4/Sox2/Nanog. *Cellular Reprogramming*, 2010, **12**(3): 237–247
- [118] Wang Y, Jiang Y, Liu S, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human β -thalassemia fibroblast cells. *Cell Res*, 2009, **19**(9): 1120–1123
- [119] Song Z, Cai J, Liu Y, *et al.* Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res*, 2009, **19**(11): 1233–1242
- [120] Zhang D, Jiang W, Liu M, *et al.* Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*, 2009, **19**(4): 429–438

The Progress of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) for Research and Applications*

FU Yu-Hua¹⁾, ZHOU Xiu-Mei¹⁾, XU Feng-Qing¹⁾, QIAN Qi-Jun^{1,2)**}

¹⁾ Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²⁾ Laboratory of Gene and Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are derived from somatic cells that regain pluripotency by the nuclear programming with exogenous factors. iPSCs have immense potential applications in establishing disease models and understanding disease mechanisms, cell therapies, drug discoveries and assessments, etc. Over the past several years, scientists made much effort to improve reprogramming technology and achieved many breakthroughs in the research and applications of iPSCs. However, moving toward the eventual goal of clinical application, it is necessary to overcome challenges such as low reprogramming efficiency and risk due to tumorigenicity, besides the detailed mechanism of reprogramming remains to be elucidated. Here, combined with the recent advances in iPSCs, the progress of iPSCs were reviewed for research and applications. The current problems and the directions of future iPSCs research were discussed.

Key words somatic cell reprogramming, induced pluripotent stem cells (iPSCs), disease model, cell therapies, small molecules

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00333

* This work was supported by a grant from China National Funds for Distinguished Young Scientists (30925037).

**Corresponding author.

Tel: 86-571-86843185, E-mail: qianqj@163.com

Received: June 24, 2010 Accepted: September 7, 2010