

VII 干细胞重编程的iPS技术

1996年，“多莉”羊克隆事件震惊全世界^[1]；1998年11月，威斯康辛大学(University of Wisconsin)的James Thomson和约翰·霍普金斯大学(Johns Hopkins University)的John Gearheart分别报道，用不同的方法获得了具有无限增殖和全能分化潜力的人胚胎干细胞(ES细胞)^[2]。这些消息的连续发布立刻引起了世界的关注，并引发近十年干细胞研究的热潮。2007年，继“多莉”出现后，科学家们在干细胞研究中再度取得了突破性的成就—将人类的体细胞通过重编程技术成功获得干细胞。这一成就无疑将会给移植治疗、药物发现及筛选、细胞及基因治疗和生物发育的基础研究等带来深远的影响，打开在体外生产所有类型的可供移植治疗的人体细胞、组织乃至器官的大门。

1. 干细胞的重编程

多年来，干细胞的研究一直是一个美丽的梦想，是一个关于“不死”和“永生”的梦想。近十年，这个梦想似乎逐步成真。

早在1970年，Martin Evans首次从小鼠胚囊中分离出小鼠胚胎干细胞，并可以成功地在体外进行培养^[3]。小鼠胚胎干细胞似乎具有发育成为某一种器官的能力。人们把“干细胞”这种超凡的分化能力称为“干性”。

这些年来，许多科学家热衷于研究干细胞的“干性”。一开始，他们只是因为对“干细胞”充满好奇，期望从分子水平上解释“干性”。后来，他们开始幻想，是否可以通过分子生物学技术，给体细胞赋予“干性”。这就有了重编程技术。

干细胞重编程技术是不经过胚胎而获得多能干细胞的方法，通过基因重组或者细胞融合等方法，影响染色质的表观遗传修饰，调控基因的沉默与表达，使得成体细胞逆分化获得多能胚胎干细胞，从而赋予该细胞多能性，实现细胞返老还童。目前，干细胞相关研究热点众多，基因重组的重编程技术成为当中热点中的热点。

体细胞重编程为多能干细胞的方法主要有三种：多能干细胞与体细胞融合；通过特定基因的表达将体细胞重编程逆转为干细胞；多能细胞的提取物与体细胞共孵育^[4]。

2. 重编程技术与iPS

2006年，日本京都大学(Kyoto University)科学家Takahashi和Yamanaka选择了已经证实与“干性”相关的24种基因作为候选因素，寻找能够诱导体细胞转化为其它类型细胞的关键因子^[5]。研究发现其中的四种基因：Oct-3/4、Sox2、c-Myc和Klf4通过一种逆转录病毒载体，导入小鼠皮肤成纤维细胞中，可以使来自胚胎小鼠或者成年小鼠的不同的纤维原细胞拥有胚胎干细胞的多能性。他们将经由这种方法获得的胚胎干细胞命名为“诱导性多潜能干细胞(iPS)”。这些iPS细胞能表达ESC的各种表面标记，可以分化为各种组织细胞。可是，iPS首次在公众面前亮相并没有引起太多的重视，因为，他们获得的胚胎干细胞无论是在基因表达模式还是在“表观基因组学”(epigenomics)上和自然的胚胎干细胞都有一定的距离。

2007年，Yamanaka研究组再度出击，与美国威斯康辛大学麦迪逊分校的俞君英和Thomson等分别发布了利用人体皮肤细胞成功诱导生成类似胚胎干细胞性质的全能干细胞的研究成果^[6, 7]。以上研究成果论文经权威的《科学》和《细胞》杂志刊登后，全球学术界和舆论即为之轰动，毫无疑问，这项惊人突破将是干细胞技术在医学

上广泛应用的基础。

在人类的iPS中，他们采用了NANOG作为分子标记，获得的细胞全能性更接近胚胎干细胞。经表观遗传学分析证明，在DNA甲基化、H3K4、H3K27甲基化，X染色体失活等方面，都接近正常的胚胎干细胞。而且这些iPS植入生殖系统后可以正常发育。这些都比2006年采用Fbx15作为筛选标记得到的鼠类iPS更为进步。

3. iPS分子机理

在这些因子当中，Oct-3/4在干细胞研究中最先受到关注，它们毫不例外地都是转录因子，通过调控基因的转录与表达，决定干细胞的“干性”。

2003年，同时发表在《Cell》第113卷的两篇文章，让科学家们距离最终揭示决定干细胞自我更新和保持多能性的分子因子的目标，又迈进了一步^[8]。Yamanaka研究组发现一个在小鼠胚胎干细胞和移植前胚胎中专一表达的基因。该基因编码的Nanog蛋白是一种具有阻碍分化作用的同源异型框转录因子（homeobox transcription factor），对于维持小鼠胚胎干细胞多能性起到很重要的作用。同样，英国科学家在人和小鼠胚胎干细胞中也分离到这一类类似基因产物，但在分化过的细胞中却不见其踪影。他们根据苏格兰凯尔特传说中长生不老的乐土（Tir nan Og），将之命名为Nanog基因。据证明，Nanog对于维持小鼠胚胎干细胞的自我更新能力很重要，并且它在早期将要分化成胚胎干细胞的胚胎中也有表达。他们还揭示了，与早期确认的保持干细胞多能性的STAT3途径不同，Nanog作用于另一条独立的保持干细胞多能性的信号传导通路。于是，随着对Nanog功能研究的深入，逐渐拉开了重编程技术中iPS研究的序幕。

Oct-3/4为POU家族的转录因子，具有一个保守的DNA结合结构域—POU结合域^[9]。Oct-3/4含有家族的保守区—N端和C端各有一个脯氨酸富集区，它们是Oct-3/4因子的转录活性区。Oct-3/4因子能特异地识别八聚体序列，通过结合到八聚体上调节基因的转录。作为哺乳动物早期胚胎细胞表达的转录因子，它诱导表达的靶基因产物是FGF-4等生长因子，能够通过生长因子的旁分泌作用调节干细胞以及周围滋养层的进一步分化。

Oct4缺失突变的胚胎只能发育到囊胚期，其

内部细胞不能发育成内层细胞团。实验表明，无论在体内或在体外，Oct-3/4都在未分化的胚胎干细胞、胚胎癌细胞（EC细胞）和胚胎生殖细胞（EG细胞）中表达，当这些细胞被诱导分化为体细胞时，Oct-3/4表达下降，由此可见，Oct-3/4在哺乳动物胚胎发生中是一个关键的调控因子，而且可能在维持细胞的全能性及未分化状态中起着关键的作用。而且Oct-3/4是细胞全能性的标志，它能够促使ICM形成、维持胚胎干细胞未分化状态并促进其增殖，此外Oct-3/4的精确表达对于维持ES细胞的正常自我更新是至关重要的，因此，Oct-3/4的活化被认为是重编程为多能干细胞的标志。然而Oct-3/4却在间充质干细胞中低水平表达，说明Oct-3/4不是维持多能性的唯一基因。

SOX2最早是在EC细胞中被鉴定出来的，可以说一开始它就与干细胞结缘。研究结果显示，SOX2在早期胚胎发生、神经分化和晶状体发育等多种重要的发育事件中都起着关键的作用，从而引起了广泛的关注。在干细胞中，它与Oct-3/4形成蛋白复合体，一同调控FGF3、UTF1等生长因子的表达，被认为是保持Oct-3/4表达的关键因素。

美国威斯康辛大学麦迪逊分校的俞君英和Thomson研究组，采用的四因子组合“Oct-3/4、SOX2、Nanog和LIN28”，能将胎儿或者新生儿的皮肤细胞重编程为干细胞，其详细的作用机理还有待进一步探索。其中LIN28的许多功能还不完全揭示，只是在干细胞中，它能提高间叶细胞恢复过程中的重编程频率。而在已获得的iPS中，有一个细胞不表达LIN28，则证明LIN28不是必不可少的^[6]。

而Yamanaka研究组筛选得到的四因子是“Oct-3/4、SOX2、c-Myc和KLF4”。他们对这些决定因子在干细胞中的作用机制，研究得更为透彻^[10]。

c-Myc是继p53之后最受人瞩目的原癌基因，其蛋白N端可以与TRRAP、TIP48相作用，影响组蛋白乙酰化酶、ATP酶的作用，而C端含有螺旋—环—螺旋（HLH）及亮氨酸拉链结构域，在与Max蛋白形成稳定的复合物后与DNA序列（CACAGTG）相结合，调节基因的表达。1993年，c-Myc缺失的小鼠胚胎不能在妊娠中存活引起了关注，c-Myc第一次与干细胞相联系。进一步结果显示，它与血管生成及原始红细胞生成相关。

锌指蛋白KLF4是Krüppel样转录因子家族的一员，在干细胞和分化细胞中高表达。它是一个原癌基因，通过与p53、p21等原癌基因作用而在多种癌症中起抑制作用。在干细胞中，它与STAT3途径相关，并与Oct-3/4和SOX2相作用，活化ES细胞中的主要启动子Lefty1。这四个蛋白互相协同，对保持细胞的“干性”起着决定的作用。在很多方面，ES细胞与癌细胞类似，这就不奇怪为什么c-Myc和KLF4成为其中重要的一员，这两个因子互相作用，抑制细胞的凋亡。c-Myc的特异之处在于它可以使体细胞的染色体结构由紧密重新变得松散，并重组组蛋白乙酰化酶复合物。这对体细胞的转型非常重要。如果仅有c-Myc和KLF4的表达，正常体细胞会转化成癌细胞，Oct-3/4的加入把它们推入干细胞途径，结合了KLF4的Oct-3/4与SOX2共表达，最终将体细胞转化为ES细胞(图1)。

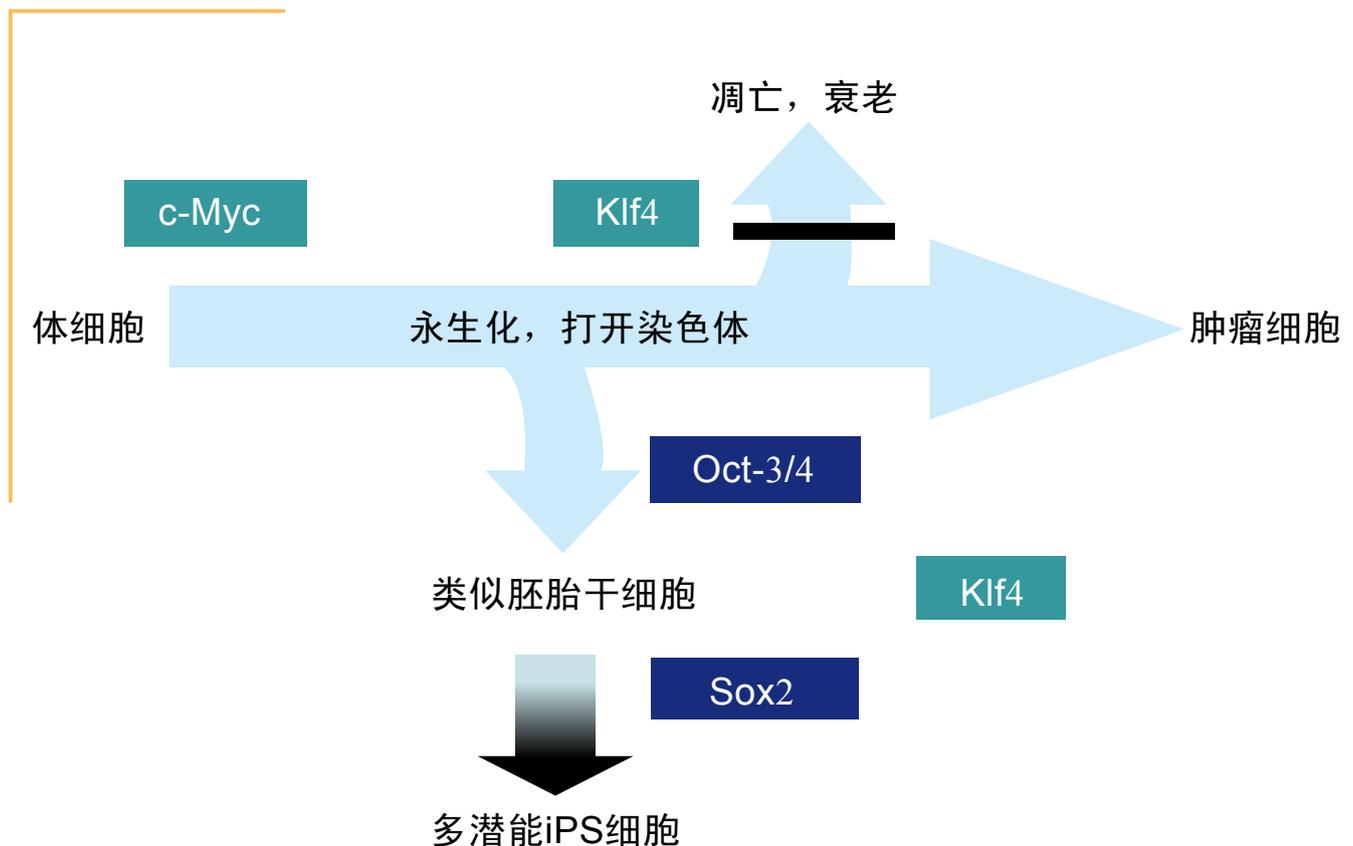


图1 干细胞四因子作用机理

4. iPS一般实验流程^[7] (以Yamanaka的iPS实验为基础)

- (1) 体细胞的培养;
- (2) 提取和纯化高质量的不含内毒素的重组质粒，构建携带目的基因的慢病毒穿梭质粒表达载体;
- (3) 使用高效重组载体和病毒包装质粒共转染293FT细胞，进行病毒包装和生产，收集病毒液；其中采用PCR方法对重组载体进行鉴定，利用绿色荧光蛋白作为报告基因,对病毒滴度和感染效率进行检测;
- (4) 浓缩、纯化病毒液;
- (5) 用高质量的病毒液感染体细胞，获得iPS细胞;
- (6) iPS细胞培养和组织学分析;
- (7) 通过定量PCR精确测定病毒滴度和Western分析实验结果;
- (8) 应用碱性磷酸酶染色法进行免疫细胞化学分析，quinacrine-Hoechst染色法确定染色体组型;
- (9) Chip-chip全基因组分析，显示DNA甲基化与组蛋白甲基化情况，阐明细胞核中染色质的状态;
- (10) 畸胎瘤形成实验;
- (11) 针对全细胞的RNA进行DNA芯片分析，显示基因表达情况;

5. 意义与展望

诱导性多潜能干细胞（iPS）不仅被国际生命科学界誉为具有里程碑意义的创新之举，而且多数人认为这一发现极有可能在若干年后问鼎诺贝尔奖，甚至有人预言，这一重大突破将在干细胞研究的科学和政策领域引发一场大地震。

干细胞与克隆技术的研究及应用几乎涉及了所有的生命科学和生物医学领域，在此之前，胚胎干细胞的获取主要还是来自早期发育的囊胚，而胚胎的这一阶段涉及许多对生命或“人”的界定问题，不同国家、不同信仰、不同民俗、不同文化背景导致了世界各国对“人”或生命的界定并不完全一致。如何看待胚胎干细胞研究成为最为激烈而敏感的伦理之争。

美国等多个国家出台了胚胎保护的法律，近十年来，其干细胞研究一直深受这些律法的束缚，而iPS可以绕过自然胚胎等伦理和法律问题，极大地解放了干细胞研究。

在很多疾病治疗中，器官移植可以起到彻底根治的效果，但人体器官移植经常面临组织移植后产生的排异反应而导致死亡。如果能利用患者本身的体细胞逆转为iPS再发育成为所需要的组织，那器官移植到排斥问题就会迎刃而解了。这正是为何众多生物医学研究者获知iPS成功后感到兴奋的最主要的原因。

但是有人欢喜有人忧，iPS成功后，通过核移植或者提取物来实现重编程的研究者都感到惶恐，他们都在担心是否以后其余的重编程方法都会被淘汰？

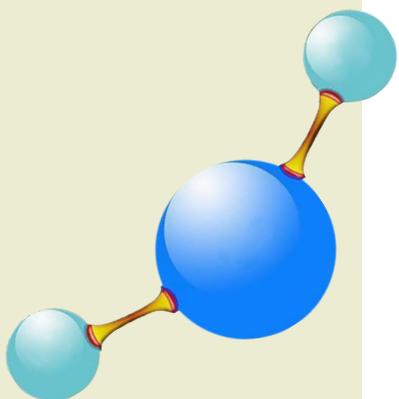
其实，iPS的成功离全面主导干细胞重编程技术还有一段距离。因为iPS还存在不少问题。

在实验成果发布之后，Yamanaka研究组随即发表声明c-MYC对iPS有致癌的作用，iPS细胞植入的小鼠近1年时间，20%出现肿瘤，而它们的c-MYC基因都高表达^[1]。在没有用到c-MYC的细胞中，他们也能成功获得iPS细胞，只是效率降低，另外，美国威斯康辛大学麦迪逊分校的研究人员植入皮肤细胞的基因中没有c-MYC，但是他们使用的皮肤细胞必须是胎儿或者新生儿的细胞，可见，c-MYC对iPS并不是必须的。

还值得注意到是，病毒载体的使用带来一些安全性问题。4种转录因子是通过慢病毒载体持续表达来转导的，而研究表明在皮肤成纤维细胞转变成iPS细胞过程中，伴随载体编码转录因子的逐渐沉默，iPS细胞多能性的维持是否需要载体的持续表达有待研究。

另一方面，在iPS实验过程中，对反应体系中质粒的纯度、慢病毒载体的效率、病毒的滴度和感染效率等要求都很高，但是得到效率却很低，重组率只有0.1%。实验的条件需要进一步优化。

总之，看起来最美的干细胞重编程技术终于开花，其中iPS方法拆除了干细胞研究与伦理、法律之间最后一道樊篱。但是，毕竟，iPS才刚刚获得初步的成功，还需要进一步的发展和优化，离临床应用都还有很长的路要走。



参考文献

- [1] Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813, 1997.
- [2] Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M.. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147, 1998.
- [3] Gail R. Martin and Martin J. Evans. Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. *Cell*, Vol 6, 467-474, December 1975.
- [4] 邱小燕, 李跃民, 体细胞重编程逆转为干细胞的研究进展, *生物化学与生物物理进展*, 1-4, 2007-10-19.
- [5] Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676, August 25, 2006.
- [6] Junying Yu, James A. Thomson et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, DOI: 10.1126/science.1151526, 2007.
- [7] Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [8] Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):631-42.
- [9] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 1998, 95: 379~391.
- [10] Shinya Yamanaka. Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 39-49, July 2007.
- [11] Shinya Yamanaka. Safer way to make human stem-like cells revealed. *Nature* 450, 775, 5 December 2007.

慢病毒表达载体

慢病毒（Lentivirus）表达载体是以HIV-1（人类免疫缺陷1型病毒）为基础发展起来的基因治疗载体。与一般的逆转录病毒载体不同，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。慢病毒载体的研究发展快速，研究的层面也非常深入。该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而达到持久性表达。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞，从而达到良好的基因转染效果，在美国已经应用于临床基因治疗研究，效果非常理想，因此具有广阔的应用前景。