

## 二、iPS细胞增殖的原种模型和随机模型

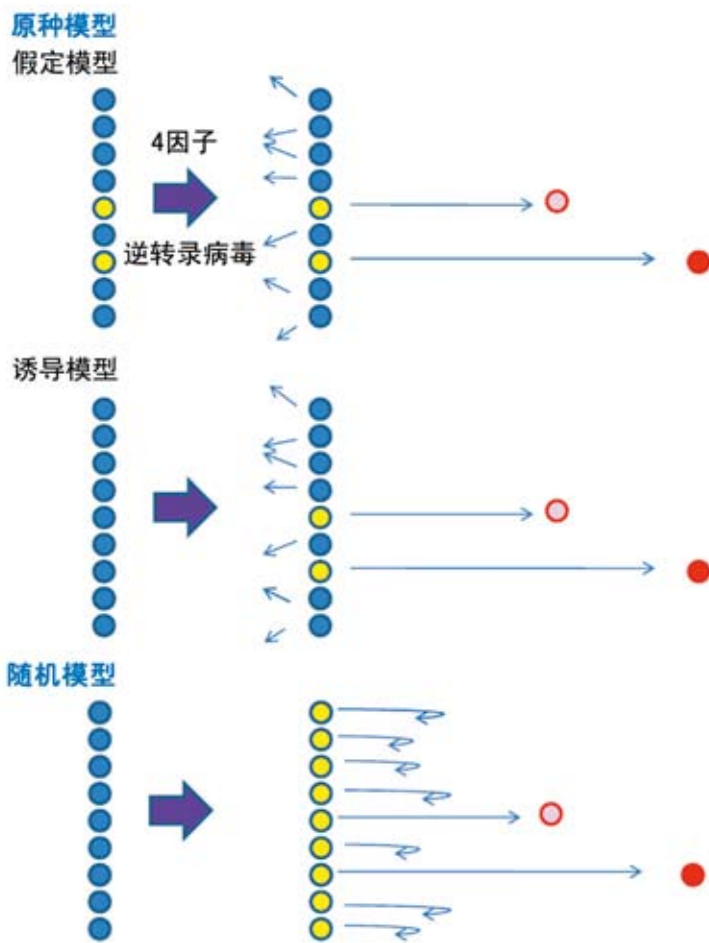


图6 解释iPS细胞形成效率低的两种模型。在原种模型中，只有一少部分的细胞，不论在逆转录酶病毒转导之前还是之后，能够部分或完全的被重编程。在随机模型中，大多数的细胞开始都可以开始重编程过程，只有少数能够获得完全的重编程。黄色，能够重编程的细胞；粉色，部分重编程细胞；红色，iPS细胞。

iPS细胞为疾病研究、药物筛选、毒理学和再生医学描绘出了史无前例的前景。然而，重编程的效率很低，并且许多细胞重编程不完全。下文将对造成iPS细胞增殖瓶颈的原因提出一些假说，同时提出大多数或者所有细胞有潜能成为多能性细胞的模型。

从2000年开始，Yamanaka实验室开始尝试用维持胚胎干细胞多能性的因子来诱导体细胞成为多能干细胞。基于这些因子在小鼠胚胎干细胞中的重要性 and 表达特异性，Yamanaka实验室选出24个因子作为最初的候选者。

为了评定这些因子的作用，Yamanaka实验室用逆转录病毒将这些基因导入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast, MEF)中。这些细胞具有抗性基因，只有当*Fbxo15*（鼠胚胎干细胞中一种维持多能性的基因）表达时，抗性基因才会表达。Yamanaka推测，当重组的24个基因表达并诱导了细胞回到多能状态时，*Fbxo15*也将被开启。

当这24个候选基因被逐一导入成纤维细胞并用药物进行筛选，没有克隆能够出现。而Yamanaka实验室用含有全部24个基因的逆转录病毒进行试验，便出现了若干克隆。令Yamanaka实验室更加惊奇的是，这24个基因中只有4个是形成少量干细胞样克隆所必需的基因。这4个基因都是转录因子，它们是：*Oct3/4*（也称*Pou5f1*）、*Sox2*、*Klf4*和*c-Myc*。Yamanaka实验室发现，他们可以重编程来自胚胎和成年老鼠的成纤维细胞。

这些被Yamanaka实验室称为“诱导性多能性干细胞（iPS）”的重编程细胞，在形态上和胚胎干细胞相似，它们可以表达重要的胚胎干细胞标志基因，将它们注入小鼠会形成畸胎瘤（包含不同组织型的瘤）。然而，最初的iPS细胞与胚胎干细胞具有不同的全基因表达模式，而且当把它们注入早期小鼠胚胎中，它们并没有形成嵌合体的能力。这些性质表明，这些iPS细胞没有完全的重编程。后来，最终通过改进诱导方法，Yamanaka实验室团队获得了能够产生嵌合体并能进入生殖细胞传代的小鼠iPS细胞。在2007年，用重组了的相同的或是有稍微改变的基因的逆转录病毒或慢病毒，人的成纤维细胞也可以被重编程到多能性状态。

虽然通过病毒转导这些确定的因子，可以重复形成iPS细胞，但是只有少部分的被转导的细胞能够在最后具有多能性。最初报道的具有克隆形成能力的iPS细胞，效率只有大约0.05%——这就意味着，平均在2000个成纤维细胞中，只有一个可以形成多能细胞。而且有些小组报道，那些看起来具有多能性的细胞，实际上只有部分重编程，它们得依赖转基因的外源因子持续表达。

低效率和部分重编程，对人的iPS在基础研究、药物筛选、毒理学及再生医学等方面的应用造成了巨大的障碍。这里提出了2种模型——原种模型和随机模型——来解释iPS的低效率和部分性质（图6）。原种模型假设，直接重编程只能在一小部分被转导的细胞中发生；随机模型假设，大多数或是全部的被转导的细胞具有重编程的能力。Yamanaka在这篇文章中的观点支持随机模型。

## ► 1. 原种模型 ◀

这个模型假设只有少数细胞有重编程的能力。此模型可以被进一步分成两种：“假定原种”模型和“诱导原种”模型（图6）。

### 1.1 假定原种模型

在假定模型中，一小部分的细胞在未经过逆转录病毒转导四个因子之前，就已经具有了重编程能力。组织干细胞和其它具有再生能力的组织中的未分化细胞，是“原种”的良好候选者，它们有能力可以进行重编程。通过核转移（体细胞核转移或SCNT）进行重编程，用分化较少的原始细胞的细胞核——如神经干细胞或是胚胎干细胞得到的重编程效率要比来自末端分化细胞，如淋巴细胞高得多。同样的，用确定的因子诱导多能性，越原始的干细胞越是优先被重编程。多能干细胞也存在于如皮肤的成体器官和组织中。在皮肤中，干细胞约占总体的0.067%，这个数字与Yamanaka实验室最初报道的iPS形成效率十分相似。

然而，有4点证据反对假定原种模型。第一，目前iPS的诱导效率比最初的报道要高很多。通过简单的延长使Nanog表达的药物选择时间，就可使效率提高10倍——0.5%的MEF可以变为iPS细胞。而且，在Yamanaka的实验室逆转录病毒感染MEF通常可以达到2%的重编程效率。通过使用特殊的化学药物，这个效率可以被进一步提高。据报道，使用丙戊酸这种小分子物质结合4个因子，可以使10%的MEF重编程。但在最初的成纤维细胞中，并不存在2%—10%的组织干细胞或者未分化细胞。虽然重编程因子或者化学处理可能优先提高组织干细胞或者原始细胞的增殖，但似乎更多的体细胞也被重编程，形成iPS细胞。

另一个支持随机模型的独立的证据来自遗传谱系痕量分析。除了成纤维细胞，iPS细胞已经来自包括肝脏和胰脏的多种组织中形成。利用Cre-loxP系统得到的iPS进行遗传谱系痕量分析

表明：大多数从肝组织中得来的iPS来源于表达白蛋白的细胞。同样的，很多来自于胰脏的iPS来源于表达胰岛素的细胞。这些数据并没有证明终末分化细胞可以形成iPS，因为白蛋白和胰岛素在原始细胞、成熟的肝细胞及胰脏β细胞中都有表达。尽管如此，这些发现还是明确的证明了那四个因子可以重编程已经分化的，能表达白蛋白或是胰岛素的谱系定型细胞。

更加直接的证据是Hanna等人获得了来自B淋巴细胞的iPS细胞。他们通过展示球蛋白位点的遗传重组，证实了终末分化细胞的起始。尽管需要骨髓转录因子（CCAAT/enhancer binding protein alpha, CEBP $\alpha$ ）的异位表达，或者是B细胞转录因子Pax5的特异敲除，同时需要4个重组因子的诱导，他们的数据还是证明了种系定型的细胞可以通过确定的因子重编程。

这些证据说明，如果不是全部细胞，大多数体细胞也可以变成iPS细胞。然而，某些类型的细胞可能更加容易重编程。的确，小鼠神经干细胞只用*Oct3/4*这一个因子就可以直接重编程。

## 1.2 诱导原种模型

在这个诱导模型中，宿主细胞基因组中除了这四个因子之外的某些基因，需要被病毒插入来激活或失活（图6）。因此只有具有特殊的病毒整合位点的细胞才有能力重编程。然而有很多证据并不支持这个观点。

起源于上皮细胞或组织的iPS细胞，比如肝脏细胞、胃黏膜细胞和皮肤细胞，比起源于成纤维细胞的iPS逆转录病毒整合少。利用这个现象，Yamanaka实验室使用反式PCR来检测分别来自肝细胞和胃细胞的两个iPS克隆中的逆转录病毒整合位点。在这个研究中没有发现任何确定共同的整合位点。最近报道，来源于小鼠MEF的6个iPS克隆没有发现共同的逆转录病毒插入。这些数据意味着逆转录病毒并没有整合进入会形成iPS细胞的特殊位点。

更加直接的证据来自若干并不使用逆转录病毒诱导iPS的研究。使用腺病毒诱导表达4个因子可得到来源于成年小鼠肝脏的iPS。另一个研究小组使用2个质粒将MEF诱导成iPS细胞，其中一个质粒是用2A（可自剪切的肽段）连接的*Oct3/4*、*Sox2*和*Klf4*，另一个质粒连接了*c-Myc*（也称*Myc*）的cDNA。两个小组都表明了得到的iPS细胞的基因组中，没有腺病毒的整合和质粒的插入。最近，iPS细胞又通过四种因子的蛋白诱导成功。而且，人的iPS细胞也通过随体表达载体诱导形成。在这些iPS克隆中，某些克隆的随体DNA在培养过程中会自动随着分裂稀释而消失。

然而，没有通过逆转录病毒形成的iPS细胞效率很低。如用随体诱导，需要用包括癌基因SV40在内的7个因子。这暗示着插入突变对形成iPS不是必需的，但是可以促进这个过程。如果是这样的话，在不同的克隆之间整合位点就没有相同的必要。用逆转录病毒或是慢病毒激活或是失活内源基因，可以提高增殖，降低凋亡，或者提高重编程，推动iPS细胞的形成。但是，逆转录病毒插入的位置和数量会对转入基因的表达量、平衡性、持续性及沉默造成很大的影响。这就可以解释为何只有少部分的转导细胞完成了重编程过程。

## ► 2. 随机模型 ◀

在随机模型中，用四个因子诱导过后，大多数或者所有的分化细胞都有成为iPS的潜能。细胞分化经常被描述为一个球沿表观遗传的状态往下滚动，Conrad Waddington在1957年最先对

其进行描述，细胞从全能状态，穿越多能状态，最终滚落到一个谱系定型的状态（图7）。在正常的发育过程中，细胞的多能性状态短暂的存在。它们无法在斜坡上停留，被重力拉下去，并且迅速的分化为各种谱系。与正常发育相对的，确定的胚胎干细胞能够自我更新，并能长时间维持多能性。因此，胚胎干细胞似乎是受到碰撞或者遇到障碍，停留在它们特有的表观遗传状态。在这种假说中，是4种重编程因子合作将细胞推到了多能的状态。

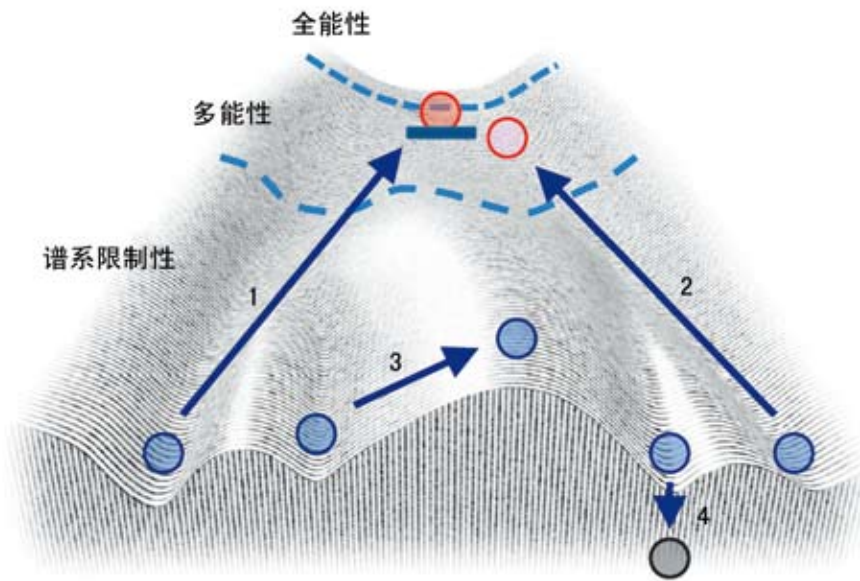


图7 随机模型。全能的受精卵通过多能状态分化成各种不同的种系。在此，Yamanaka把这个过程描述成Conrad Waddington所提到的表观遗传斜坡。iPS细胞就像个沿山谷滚下坡的球，重编程的因子共同将它们沿坡推到了多能区。一些细胞被表观遗传的状态（矩形所示）阻挡在坡上，并且开始自Yamanaka更新（1）另外一些细胞只有部分重编程，并没有被挡住，因此在没有外源因子的时候，它们会重新滚下；（2）当这些重编程因子表达不合适的时候，细胞有可能转变成另一种细胞类型；（3）甚至走向凋亡或衰老；（4）那些在山谷中部的细胞（体细胞），可能相对容易回到多能性的状态。

完全的重编程，至少要有两方面的需要。首先，四个因子必须有足够的表达量，可以以正确的方向推动细胞状态。因为现在的技术还无法精确到控制4个基因的表达，达到第一个要求只能是随机的。再次，细胞必须达到被阻碍在胚胎干细胞特有的表观遗传状态的阶段，这样才能在外源基因表达消失的时候仍然保持在多能状态。由于这四个重编程因子独自还不能形成一个表观遗传的障碍，在iPS形成的过程中依旧存在着随机性。通过核转移进行的重编程提示，DNA甲基化和组蛋白修饰，很可能在形成iPS的过程中扮演重要角色。

## 2.1 重编程因子的表达模式

直接的重编程依赖于四个因子转基因的表达量、平衡性、连续性和沉默程度。在每个iPS克隆中有高拷贝数的原病毒，这说明强的外源基因表达是最初的需要。Klf4在成纤维细胞中表达，但是内源基因的表达不足以形成iPS。内源的*c-Myc*基因也在成纤维细胞中表达，但是它的异位



表达能够在形成小鼠和人的iPS时使效率显著提高。

iPS细胞的形成也可能依赖于四个因子特有的随机平衡。如过量的Oct3/4和Sox2对于维持多能性是有害的。实际上，在那些也表达内源Sox2的神经干细胞中，四因子的iPS形成效率要高于异位表达的只有其它3因子而没有Sox2情况下的iPS形成效率。c-Myc与Klf4之间的平衡对于由这些癌相关基因造成的凋亡和衰老起到决定性作用。这4个因子的不平衡会导致不适当的重编程，衰老甚至凋亡。

外源基因的持续表达和沉默也是十分重要的。在初始的10到14天，外源基因必须持续表达。在这方面，逆转录病毒载体明显优于质粒和腺病毒。然而，为了完成重编程，在过了初始阶段后，外源基因必须沉默，取而代之的是内源基因。如果外源基因无法沉默，会导致所谓的部分重编程细胞具有胚胎干细胞的形态，并且表达一些胚胎干细胞的标志基因，但它们的分化能力有限。

外源基因的导入方法对它们的表达量、平

衡性、持续性和沉默情况有很大影响。使用逆转录病毒和慢病毒，会对原病毒的整合位置产生很大影响。这就可以解释，为什么只有一小部分的诱导细胞能够完成重编程过程，因为每个诱导细胞有其独特的整合样式。如果是这样的话，用含有重编程组分的、整合了外源基因的成纤维细胞，将会使iPS的形成效率显著提高。

该实验最先由Werning等完成，他们把用强力霉素诱导的iPS细胞注射进囊胚，然后从嵌合胚胎中分离了MEFs，这时再用强力霉素处理这些MEFs，形成“二次”iPS。随后在人细胞上作了同样的处理。通过强力霉素调节的慢病毒获得人的初级iPS，然后诱导分化，得到成纤维细胞，二次iPS细胞用强力霉素再次诱导形成。在这些实验中，有4%的成纤维细胞变成iPS细胞。最近，一种用piggyBac转座子的方法达到了约20%的重编程效率。这些发现表明，只要这些有外源基因插入的细胞中含有合适的样式，便可以提高成为iPS细胞的效率。

## 2.2 重编程所需的表观遗传状态

即使当四个因子正确的表达，将细胞抬到谷顶，在没有外源基因的表达下细胞可能会再次滚落。细胞需要被特殊的表观遗传状态所固定（图7）。这四个因子的内源位点需要被完全激活。一个重要的方面是DNA甲基化的正确性。在成纤维细胞和体细胞中与多能性相关的基因，它们的启动子区严重甲基化，但是在胚胎干细胞和iPS细胞中却没有甲基化。因此，在直接的重编程过程中，这些区域的DNA必须完全去甲基化。因为这四个因子没有自带的DNA去甲基化活性，这个过程可能需要细胞分裂的二次效应。这可能是iPS细胞形成很慢并且效率低的原因。事实上去甲基化试剂，如5-氮胞苷，在此模型中可提高iPS细胞的形成效率。

iPS细胞的形成，也需要正确的组蛋白修

饰。在胚胎干细胞和iPS细胞中，与多能性有关的基因在启动子区的组蛋白H3和H4高度乙酰化。相反，已分化细胞H4的乙酰化程度低。因此，这些区域的H4在形成iPS的过程中被乙酰化。因为这些转录因子自身没有组蛋白修饰活性，所以需要其它因子。C-Myc的一个功能就是为目的基因征募乙酰化酶。事实上，组蛋白去乙酰化酶的抑制剂，如丙戊酸，可以提高iPS细胞的形成效率，这一现象支持在直接重编程过程中组蛋白乙酰化十分重要这一观点。

在阻止iPS细胞形成的过程中，组蛋白的甲基化也是十分重要的。在胚胎干细胞和iPS细胞中，多能性相关基因启动子区，H3在第4位赖氨酸甲基化，在第9位赖氨酸去甲基化。成纤维细胞中含有相反的组蛋白修饰模型。但是，胚胎干细胞和iPS细胞都有称为发育基因

的二价染色体结构，组蛋白H3赖氨酸27位和4位上都是甲基化状态。这些组蛋白的甲基化状态，是为iPS细胞的形成建立起来的。

iPS技术目前仍处在初期阶段，然而它的潜能不可小觑。病人的和疾病特异的iPS细胞为了解发病机理、研发更加安全有效的药物提供了空前的细胞资源。而且，将来iPS技术可以将细胞移植技术变为现实，用来治疗各式伤病，并且可以防止发生伦理问题和免疫排斥。为了达到治疗的目的，我们必须获得完全均一重编程的iPS细胞。如果这点失败，将会导致

无法分化，提高成瘤的危险。随机模型预测iPS细胞可以用多种体细胞，用不同的方法得到。我们需要评估不同的细胞和不同的诱导方法，确定能够形成应用于临床的最安全的iPS细胞。

文献来源：Shinya Yamanaka (2009) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation, *Nature*, 460(7251):49-52



GIBH干细胞与癌症研究组/编译

### 三、产生诱导性多能干细胞的指导方针和技术

直接将体细胞重编程为多能干细胞为再生医学提供了极其宝贵的资源，它使得用非胚胎材料获得病人特异的任何谱系的细胞成为可能。虽然现行的获得诱导性多能干细胞的方法各异，但其核心都依赖于一组经选择的转录因子。这篇文章比较了目前所有文献报道的方法流程，确定了这些流程中必要的共同步骤，并推荐定义完全重编程细胞的最低标准。此外，还列举了一些旨在优化iPSC过程可重复性的特殊的处理方式，重点强调了对某些参数的标准化以方便对不同的独立实验进行精确的比较。

由成体分化细胞诱导而来的多能干细胞具有广阔的应用前景，尤其是在体外疾病模型、药物筛选、细胞取代治疗等领域。此外，将体细胞回复为胚胎干细胞的这种技术为探索由一种细胞类型转换成另一种细胞类型的分子机制提供了独特的手段。

先前设计的多能性诱导策略，比如体细胞核转移（克隆）或者体细胞与胚胎干细胞（ESC）融合，都遇到到技术、伦理和材料保

障上的障碍，从而阻碍了这些多能性细胞在理论研究和治疗上的应用。因此，采用非胚胎材料直接产生多能性干细胞被认为是一个更为恰当的策略。这种策略更有利于机制的分析，而且也不会牵涉过多的伦理问题。

直接将体细胞重编程为胚胎干细胞的技术完成于2006年。Takahashi和Yamanaka通过外源表达一组选择性的转录因子将成体小鼠成纤维细胞逆转为诱导性多能干细胞（iPSCs）。后续的报道优化了这一技术，同时通过一组严格的分析，证明iPSCs事实上与胚胎干细胞（ESCs）极其类似。2007年，直接重编程在人类细胞中取得成功，为再生医学做出了无法估量的贡献。

尽管iPSCs细胞系的建立在概念和技术上都很简单，直接重编程依旧是一个包含大量未知事件的缓慢而低效的过程。为了可重复的获得iPSCs，几个可变因素必须考虑，包括：1、选择用于重编程细胞的因子；2、运送这些因子的方法；3、靶细胞类型的选择；4、重编程因子的表达参数，比如表达持续时间和水平；5、获取iPSCs的培养条件；6、识