

# 专题译述

Worthy Issues

## 诱导性多能干细胞研究进展

### 前言：回拨人类时钟的魔法——重编程技术

多年来，人们一直在研究细胞的重编程及细胞核的潜在全能性，而1998年多利羊的诞生标志着已将这一研究工作推进到哺乳动物领域。2006年，日本京都大学的Yamanaka教授在《细胞》（*Cell*）上发表了具有里程碑意义的文章，详细介绍了其用四个因子（Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc）将小鼠成纤维细胞逆转为类似多能干细胞的研究工作及结果，从此开创了iPS时代。由于同时具备深远的科学价值和广泛的应用价值，iPS技术已成为当今生物研究的热点，并在2007年分别被*Nature*、*Science*评为第一及第二大科学进展，又在2008年荣登*Science*十大科技进展榜首。本专题将从细胞核重编程，iPS诱导模式以及iPS的技术标准等方面来阐述iPS技术，对其原理、应用以及将来的研究方向做一个系统的介绍。

#### 一、细胞核重编程

细胞核重编程指的是细胞内的基因表达由一种类型变成另一种类型。早期对青蛙克隆的研究为重编程提供了初步的实验证据，之后的证据则包括体细胞核移植、细胞融合、外源基因诱导的重编程以及直接重编程。通过这一技术，可以在同一个体上将较容易获得的细胞（如皮肤细胞）类型转变成另一种较难获得的细胞类型（如脑细胞）。这一技术的实现将能避免异体移植产生的免疫排斥反应。下面将就此技术介绍一些背景理论知识、相关的机理并对细胞核重编程研究进行展望。

特约编辑：GIBH干细胞与癌症研究组

在受精卵发育成一个成熟个体的过程中，特定类型的细胞一般都是沿“单行道”形成。随着发育的不断进行，这些细胞就会逐渐失去可塑性，成为不可逆的某一特定类型细胞。例如，一个皮肤细胞不会自动地转变成为一个脑细胞，而小肠细胞也不会转变成心脏细胞。然而，却有一些实验方法可以使不同类型细胞之间的转换成为可能。这些方法都是利用细胞核重编程的原理，也就是说让一种类型细胞的核基因表达转变成成为胚胎细胞或者其它类型细胞的状况。由于以下三个原因（表1），这一机制引起了科学界的广泛兴趣。

表1 细胞核重编程引起科学界广泛兴趣的三个原因

首先，了解细胞核重编程是如何发生的，能让我们理解细胞分化以及特定的基因表达在正常情况下是如何保持的；

其次，细胞核重编程是人类在细胞替换移植领域迈出的第一步，即从另外一种类型的细胞诱导出所需的细胞，再进行替换治疗；

最后，细胞核重编程使从疾病组织中诱导出可培养细胞然后用于药物筛选成为可能。

接下来，我们将对上述重编程方法展开介绍，讨论其背后的机制问题，并且还将探讨这一领域未来的发展方向。

## ► 1. 卵细胞和卵母细胞的核移植 ◀

将一个活细胞核成功地移植到已经去核的蛙卵中的实验，首次证明可以通过实验方法来逆转细胞的分化状态。Briggs和King首次成功实现通过移植*Rana pipiens*的囊胚细胞核产生会游动的蝌蚪。但是，他们发现如果移植的是处于胚胎发育较晚阶段（肠胚）的细胞核，就会出现非正常发育现象。于是，他们提出细胞分化可能涉及不可逆转的细胞核转变。不久之后，有人在南非青蛙*Xenopus laevis*上进行了相似的实验。按照同样的实验方法，他们发现即使用于移植的核是来自于完全分化的细胞，也能得到发育完全正常并且具有生育能力的雄性和雌性青蛙，在该实验中是供体蛙的小肠上皮细胞。这些实验结果告诉人们，细胞分化是可以被完全逆转的，并且不可逆的细胞核变化是非必须的。这一过程涉及细胞核基因表达的改变，但并不涉及基因本身。因此，即使在发育过程中，细胞之间也能变成彼此不同、具有各自功能且能稳定存在的个体，但是基因组在所有不同细胞类型中都是一样的（产生抗体的免疫细胞除外）。因此，它们具有保持形成其它不同类型细胞的潜力。

这一领域的突破来自于多利羊的实验，这个实验将从成体羊身上分离出来的，并且在体外培养的乳腺细胞的细胞核移植到去除了细胞核的羊卵内，从而产生出正常成体山羊。多利羊以及后来的探索研究表明，可以利用成体哺乳动物的细胞核来完全逆转细胞分化过程，并且暗示，这一个机制可能也适用于人类。通过移植成体猴细胞核得到猴胚胎干细胞的实验就是证明这一假设的重要一步。这些具有完善的生长和分化功能的细胞是从用成体猴的细胞核移植到去核猴卵细胞后发育成的胚泡中分离出来的。因此，在人类的卵子里面也非常可能包含着能逆转成体人类细胞分化进程的因子。

## ▶ 2. 细胞核重编程的效率 ◀

实现卵细胞诱导的完全重编程的公认标准是产生一个包含任何一种细胞类型（被定义为全能性）并且具有生育能力的成体个体。但是，从医学治疗的角度看，我们认为得到的细胞是否具有全能性，甚至多能性（即具有分化成大多数细胞类型的能力）（图1A）并不是一个必须具备的属性。例如，在治疗上，一个脊椎损伤的病人，就没有必要为其提供能够分化成任何一种细胞类型的细胞。在讨论体细胞核移植的时候，知道利用来源于完全不相干的另一种细胞的细胞核来进行移植，并且得到特定类型细胞的效率是很重要的。已有实验结果显示，细胞核重编程的效率会随着供体细胞的分化程度加深而降低（图2）。通过一系列的核转移实验（从一个核移植胚胎中将细胞核移植到另一系列的去核卵子中）以及核嫁接实验（从一个核移植胚胎中将细胞核移植到从同一品系受精卵发育而来的受体胚胎中），得出了约30%的小肠上皮细胞核能够产生具有功能的肌肉和神经细胞这一结论。在哺乳动物身上，可以从核移植胚胎的细胞中产生胚胎干细胞，并且可将这些细胞移植到正常的受体胚胎中去测试它们的分化能力。相对于用胚胎细胞核所能达到的30%的效率，用已分化细胞的细胞核得到正常动物的效率通常在1%到2%之间。到目前为止，还没有从相距甚远的异物种组合，包括将人的细胞核移植到猴卵母细胞的细胞质中，从而得到可以传代的胚胎干细胞的证据。

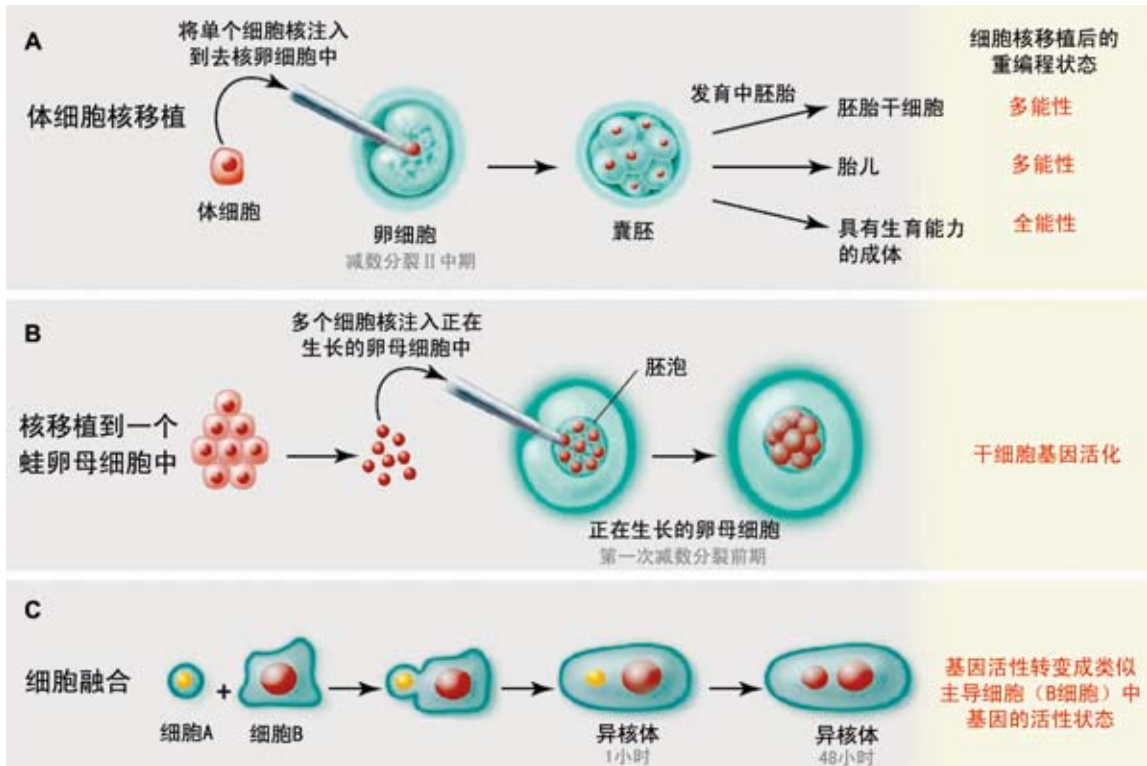


图1 核移植实验设计。(A) 核移植到未受精的蛙或哺乳动物卵（二次减数分裂期）；(B) 核移植到第一次减数分裂的蛙卵母细胞；(C) 细胞融合实验设计。

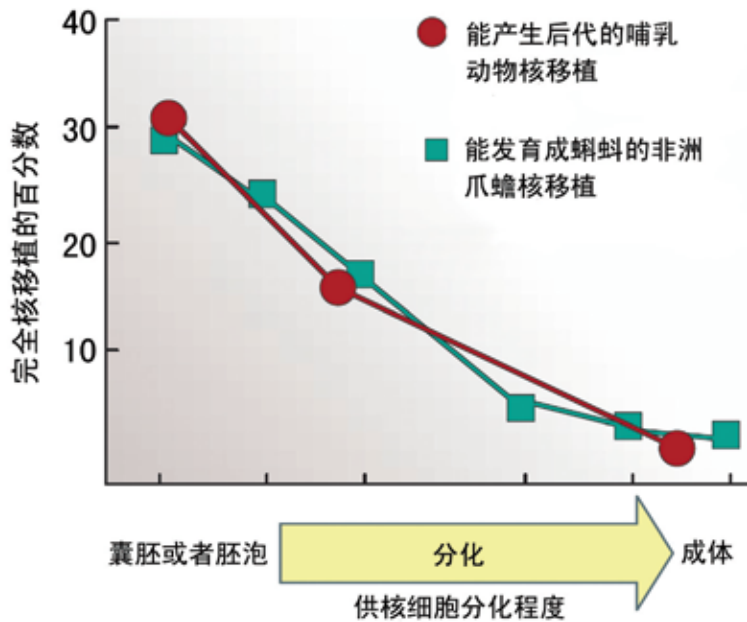


图2 核移植成功率随着分化程度的加深而下降。

### ▶ 3. 细胞核重编程的机理 ◀

用卵子进行细胞核重编程值得关注的地方是卵子具有以100%的效率重编程已经定向分化了的精子细胞核的能力。另外一个优点是利用这一方法并不需要对移植的细胞核及其产生的重编程细胞进行永久的遗传学改变（即病毒插入、强制打开特定基因等）。因此，挖掘出其中的机理就显得格外重要。我们需要解决的问题是为什么重编程能够成功实现？而又是什么因素常常导致这一过程的失败，即便是在使用卵子细胞的情况下？

有人利用卵母细胞（第一次减数分裂早期的雌性生殖细胞，是产生卵子的前体细胞）探索了卵细胞（处于第二次减数分裂中期）的重编程机制。许多移植进卵母细胞生殖泡的哺乳动物体细胞核被直接重编程而表达干细胞标志基因，包括*Oct4*、*Nanog*和*Sox2*（图1B）。在卵母细胞内进行的细胞核重编程不会产生新的细胞，但是与卵子相反的是，这一过程的发生既不需要细胞分裂，也不需要蛋白质的合成。与这个重编程伴随而生的机制包括：异染色体的开放（图3）；分化标记，如DNA甲基化的去除；组蛋白修饰以及组蛋白交换等等。这些机制发生的基础是，受精卵拥有能引起上述效应的高浓度特定蛋白。如果卵子的蛋白能够在几秒或几分钟的时间内被交换到移植进来的体细胞核的话，那么完全重编程就应该总会发生。

但是，这个概念却和另一个事实相悖，那就是卵子常常不能完全重编程植入其中的体细胞核。如果以上所说的染色体蛋白迅速交换适用于卵子里用来重编程受精卵的细胞核的话，在卵细胞第一次分裂之后，蛙类细胞就会需要一定的时间，并且哺乳动物细胞需要更多的时间去完成彻底的重编程。但这通常不会发生。一个可能的原因是移植进来的细胞核携带了供体细胞的表现遗传学记忆。例如，在肌肉细胞里取出的细胞核，用于重编程后，在重编程的胚胎里发育出来的神经或其它非肌肉细胞里还会强烈的表达与肌肉相关的基因。这可能是由卵子组蛋白里

大量存在的H3.3亚型整合到核移植后的供体细胞核里所引起的。组蛋白H3.3的表达被认为能阻碍重编程的发生，并且会保留以前基因表达的记忆。

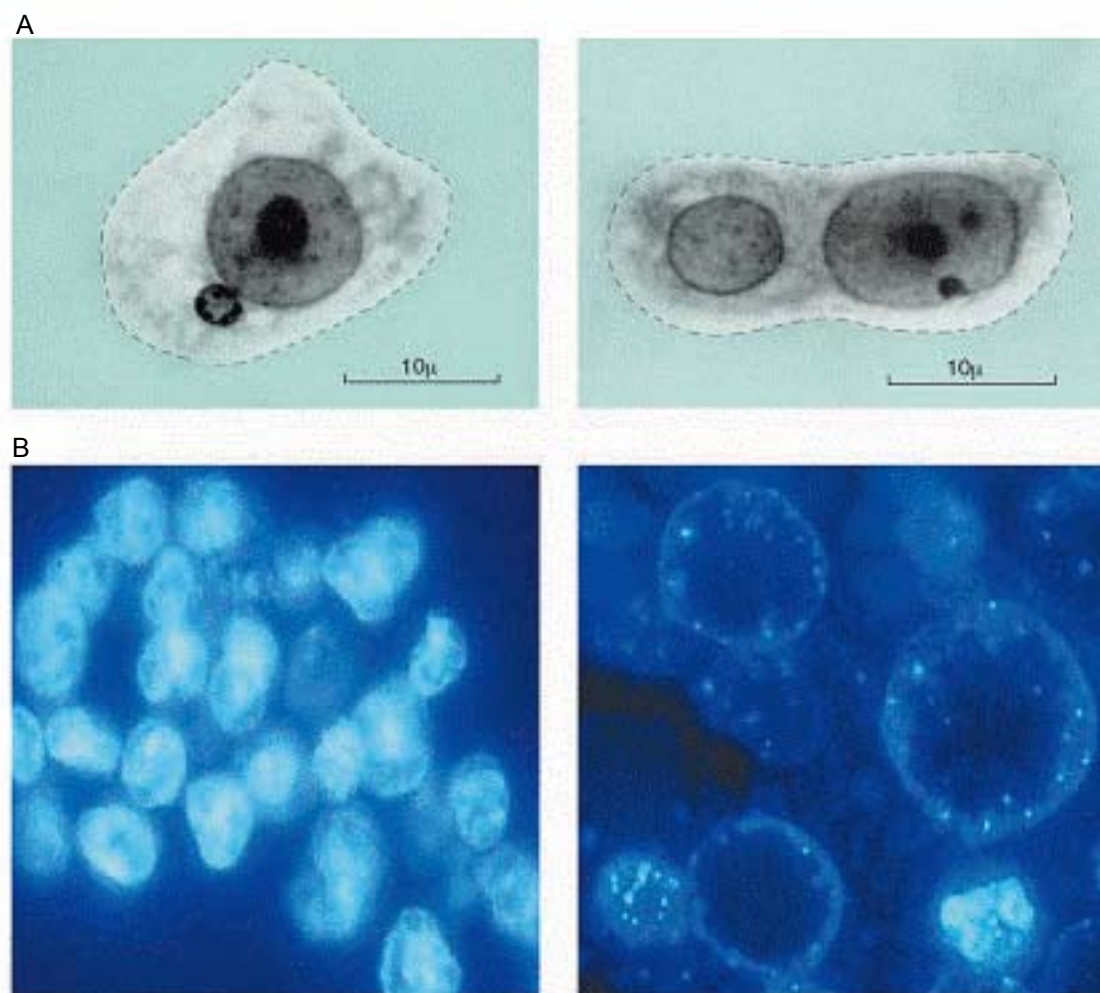


图3 核重编程中发生的核增大以及染色质的去浓缩化。(A) 鸡红血球细胞和人类HeLa细胞融合后一小时(左), 两小时(右)的情况。虚线表示融合细胞的外轮廓。较小的核是属于鸡红血球细胞的。(B) 将小鼠胚胎干细胞核注射到一个两栖类卵母细胞囊中, 左图是刚移植时的图像, 右图为注射后2天的图像。这些细胞核在体积上增大了30倍。

## ▶ 4. 细胞融合与细胞提取物 ◀

从技术发展的角度来看, 是有可能让两个细胞发生融合, 同时用细胞分裂抑制剂来保证融合后两个细胞核是分离的(图1C)。在这些融合体里面, 主导细胞通常是体积较大并且分裂活性较强的那个, 而且还会影响另外一个细胞核的基因表达情况。这方面的例子包括红细胞和体外培养的正在增殖的细胞的融合, 以及人类肝脏细胞和肌肉多核细胞的融合。如果去掉细胞核的一种体细胞的细胞质与另外一种细胞融合的话, 它们也会将供体细胞的表达谱强加于受体细胞的细胞核之上。但是, 由于这些融合细胞生长不佳, 因而也没有太大的医学意义。

我们可以从上述这些实验中得到一些重要的结论。其一, 细胞核的涨大和染色体的去染色

质化会发生在基因表达谱的重编程之前（图3）。其次，新的基因表达谱并不依赖于供体基因表达谱的退去或者细胞分裂。所以上述这些都不是重编程所必需的。再一个重要的结论就是，分化的细胞以及胚胎的细胞包含可以改变其它细胞的细胞核基因表达情况的调节分子。当受体细胞体积非常大的时候，例如卵子或肌肉束（100个或更多的肌肉细胞形成的大型细胞），它自身的调节分子大大超过可以让细胞产生出现胚胎干细胞特征的外来调节因子就变得可以理解了（图4）。这些分子在正常生理情况下的作用可能是确保这些细胞以及它们的后代不会逃离它们所属的种系或者改变细胞类型。换句话说，细胞似乎在不停地重编程自我以保证它们自己以及后代保留在原来的品系里面。

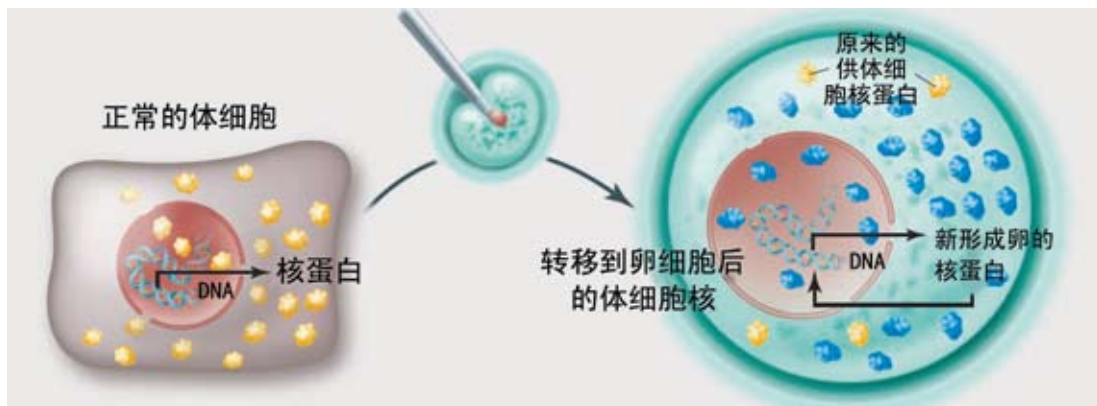


图4 当一个正常细胞（左）的细胞核移植到一个卵或卵母细胞（右），其染色体蛋白发生了交换。黄色代表供体细胞的核蛋白，维持了其作为体细胞的基因表达，蓝色代表了卵的核蛋白，代替了稀释后丢失了的体细胞核蛋白，并诱发了新的基因表达模式。

## ► 5. 诱导多能性 ◀

该领域一个惊人突破发生在2006年，Takahashi和Yamanaka发现向小鼠成体成纤维细胞里转入四个基因（*Oct4*、*Sox2*、*c-Myc*和*Klf4*）以后，这些细胞能被诱导成为具有胚胎干细胞特征的细胞。后来引入*Nanog*表达的筛选系统后，得到的干细胞移植到具有免疫耐受能力的受体胚胎时，还显示出参与发育的能力。因此可以证明它们是具有多能性的，所以叫做诱导性多能干细胞，或称iPS细胞。从人的体细胞上获得多能干细胞也需要上述的四个转录因子或者另外一组由*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*和*Lin28*组成的重编程基因。这些程序现在已经得到确认并得到了发展。实验已证实iPS细胞可以从终末分化的胃和胰脏细胞中得到，并且在去除癌基因*c-Myc*的情况下也能得到。这些干细胞似乎与胚胎干细胞并没有多大的区别，并将有可能最终培养出病人特异性细胞来进行细胞治疗，也可用于提供合适的能分化为各种组织的细胞来源，或者用来测试潜在的治疗药物。但是，这些都需要在采用改良方法去除由病毒载体引起的基因组插入隐患后才有可能成为现实。最近的成果表明，稳定的基因组插入并非必不可少，并且有研究报道称可以使用腺病毒或者质粒来传导外源基因，意味着我们离成功又进了一步。

通过导入外源因子而使分化的体细胞变成iPS细胞的机理目前还不清楚。因为在早期的实验中，这些细胞出现的比例是如此之低（起始细胞的 $1 \times 10000 \sim 1 \times 1000$ ），并且被感染的细胞一般需要在有外源因子存在的情况下增殖将近两个星期，这些看似是偶然形成的iPS细胞的来源确实难以

分析。在某些情况下，多能性状态的维持可能需要抑制分化程序，其可能涉及的机制已经在其它综述里提及。

## ▶ 6. 品系转变 ◀

通过外源表达基因来改变细胞的分化类型在很多年前就由Weintraub发现“主导基因”*MyoD*后提出了。过表达这个在肌肉细胞里特异表达的转录因子就足以将一系列非肌肉细胞转变成为肌肉细胞了。然而，在其它一些类型的非肌肉细胞里，这种转变只是暂时的，或者根本就无法观察到。在观察到肌肉样的细胞出现之前，在好几个细胞世代里对外源*MyoD*表达的选择是必需的。一旦转变成为肌肉细胞以后，*MyoD*就会激活自身的持续表达，外源*MyoD*的过表达就不再是必需的了。

细胞类型的转换在其它好几种细胞类型之间，特别是形成血液的细胞品系之间，也可以通过外源表达一些转录因子来实现。这些转录因子的相互平衡能激活或抑制决定细胞命运的基因表达。在这些变化当中（图5C），在新类型细胞形成之前，可能涉及一个倒退到分化程度较低的状态，也就是一个去分化过程。就*MyoD*而言，培养的细胞经过许多细胞分裂的选择才能最终形成新的细胞类型。

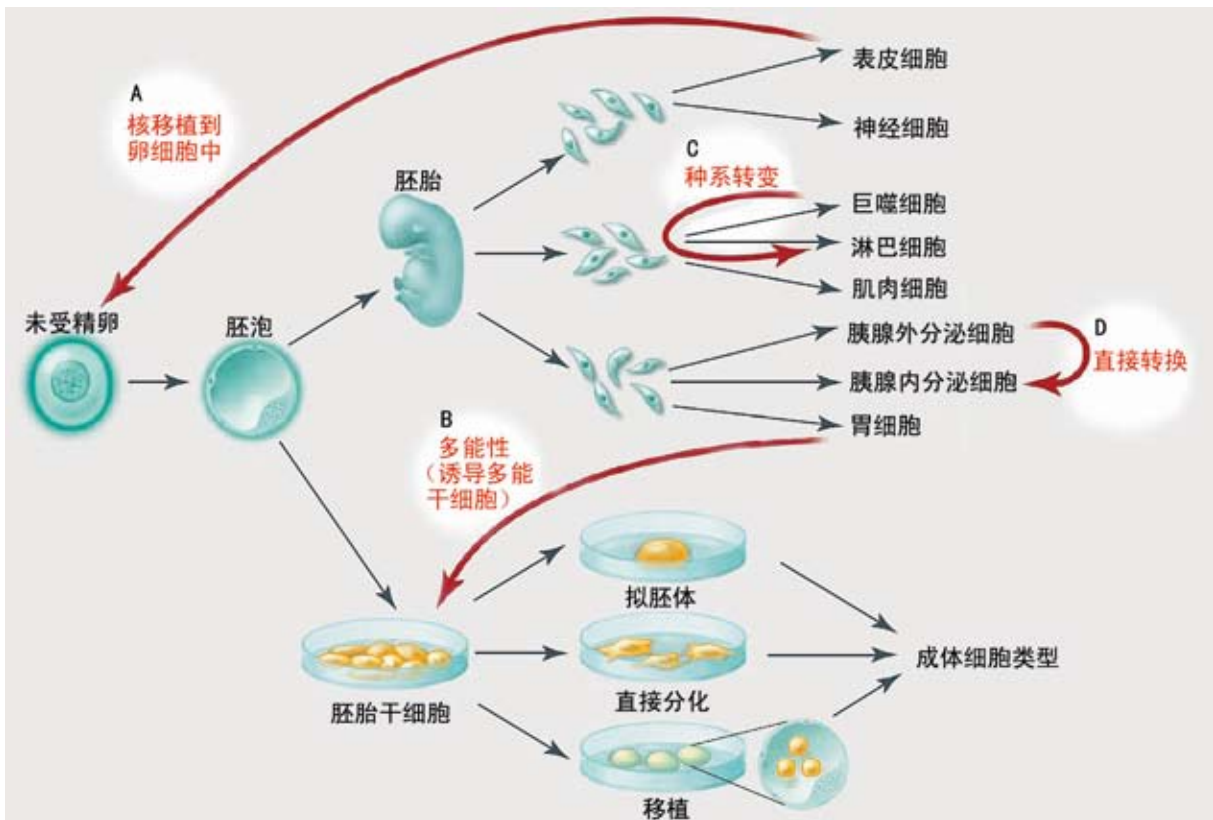


图5 核重编程的四个实验方式。蓝色物质代表从受精卵分化到成体组织细胞的正常途径。红色箭头表示核重编程。(A) 核移植到卵细胞；(B) 诱导为多能干细胞；(C) 品系转换到分化上游并选择另外一个方向；(D) 直接转换为另一细胞类型。图的下部表示通过重编程产生ES细胞，这些ES细胞可以形成拟胚体(EB)，直接分化(Diff)，或者移植到囊胚中，通过这三种方法可以产生不同类型的成体细胞。

在这个领域的一个最新的进展就是将胰腺的外分泌细胞直接转变成内分泌的 $\beta$ 细胞（图5D）。在这个研究当中，用腺病毒转入三个通常为胰岛 $\beta$ 细胞分化所需的转录因子：**Pdx1**、**Ngn3**和**MafA**后，就能够将20%的成功转染的外分泌细胞转变成能产生胰岛素的 $\beta$ 细胞。携带外源基因的腺病毒不必整合到外分泌细胞的基因组当中，并且对外源基因表达的需求也是暂时的。另外，这一品系转变并不需要细胞分裂。这个细胞品系转换和由**Yamanaka**最早做出的*iPS*一样，为转变细胞命运提供一条共同的策略，那就是设法找出一系列的转录因子来实现细胞类型之间的转变。

## ► 7. 蛋白质—DNA的相互作用和飞速逃逸 ◀

细胞分化的两个基本特征影响着我们对细胞核重编程的理解。一个是每种细胞似乎都表达着一些决定它们分化状态的基因，这一特征在细胞融合实验中尤其明显。因此，肌肉细胞就会通过自激活高水平的例如**MyoD**这样的基因去维持自身的状态。这样，细胞越大，或者越像胚胎干细胞，它就会拥有更多“自我重编程”分子。因此，卵子在没有添加外源因子的情况下也很容易被重编程。

在所有重编程的实验里，第二个基本特征是当细胞的分化程度变得越高，通过外源基因来重塑表达谱就变得越困难。当细胞开始它们的终末分化道路时，分化的细胞状态变得越来越牢固，并且堵上其它不恰当的分化途径。掌握这个理论成为这一研究领域的一个巨大挑战，并且大量的信息化工作已经在DNA和组蛋白层面上展开了。一个普遍的假说就是“快速逃逸”策略。我们提出在非活性转录基因的调控区，DNA和组蛋白的结合会变得越来越紧密。虽然大多数的蛋白质会以几秒钟或几分钟一次的频率解离与之结合的DNA，并且在一些特殊情况还需要更长的时间，一个由多组分组成的蛋白复合物则可能会在DNA上拥有很长的逗留时间。因此，一个蛋白复合物的所有组分都刚好解离DNA，并且让重编程因子结合上去的几率非常小。在胚胎干细胞里，大多数基因（在分化的细胞里这些基因是具有活性的基因）就会处于一种去浓缩的状态，使大蛋白复合物具有较短的逗留时间。

根据这个假说，无论是通过核移植、细胞融合、*iPS*，还是转分化来实现的重编程的发生几率都依赖于统计学上DNA调控区域的可进入程度、作用时间、转录本的浓度和其它调控因子。体积大并且拥有大量调节因子的细胞，如卵子和肌肉管，就会像其它通过实验增强转录因子浓度的细胞一样容易被重编程。未来，一个重要的突破就是要掌握为何分化后细胞的细胞核比胚胎细胞的细胞核更难以重编程。这可能涉及到了组蛋白去浓缩化的解释。

## ► 8. 展望未来 ◀

核移植、*iPS*技术以及转分化之间的机理会不会是一样的呢？或许不会。快速逃逸的概念可能都适用于上述几种情况，不过实际上起重编程作用的因子是不尽相同的。我们已经知道卵细胞具有某些浓度非常高的分子，如核浆、组蛋白**B4**以及组蛋白**H3.3**等。而最终识别出卵细胞重编程因子，将有助于改善*iPS*的效率和找到更多成体细胞之间品系转换的途径。



表2 在未来具有重要应用价值的两类重编程细胞

一类是从某种遗传病人身上获得的能够长期培养的细胞系，用以测试潜在的治疗药物或者用于治疗；

另一类是能够提供用于细胞替换治疗（即再生治疗）的细胞。

表3 作为治疗用途的细胞可能具有的特性

能够提供足够数量的细胞；

能够在正常情况下不整合入受体组织而发挥它们的作用；

能够产生恰到好处数量的产物。

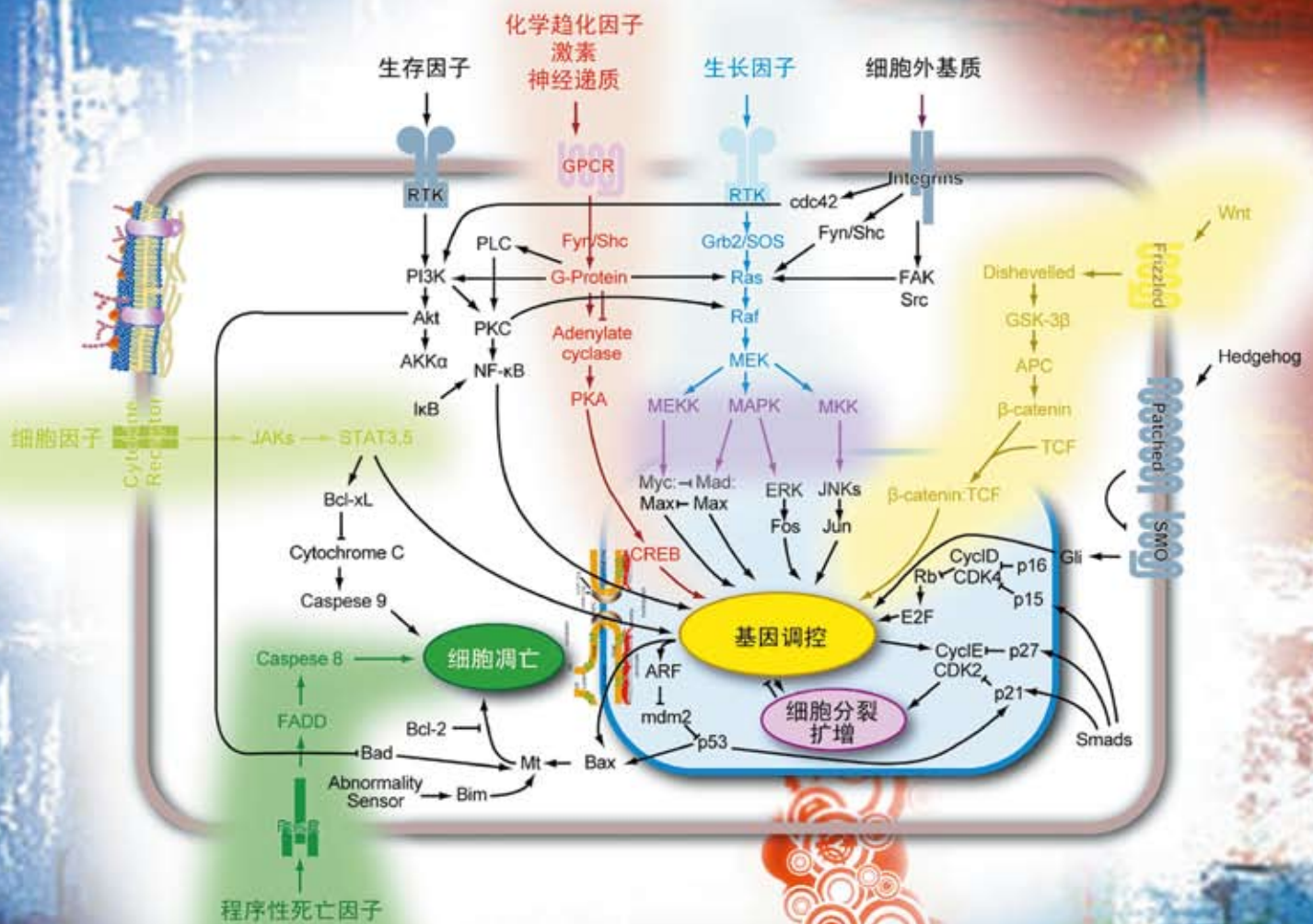
一个人拥有 $10^{15}$ 个细胞，而一个肝脏就包含 $10^{14}$ 个细胞。为了达到这个数目，一个以 $10^4$ 的效率从皮肤产生出来的iPS细胞需要经过大量的细胞分裂周期才可达到。尽管如此，人体的某些组织只需要相当少量的细胞就能改善功能了。一个例子就是视网膜，仅 $10^5$ 的细胞就具有治疗效应。

要是导入的细胞没有“整合”到受体里面的话，这些细胞还会有利用价值吗？大部分的组织是由许多不同类型的细胞组成的。以胰脏为例，包含了外分泌细胞、管道细胞以及胰岛细胞在内的至少四种能分泌激素的内分泌细胞。内分泌细胞的替代治疗具有巨大的治疗价值，即使它们并没有整合到胰脏复杂的结构当中。在某些情况下，导入的细胞即使是以间接的形式也能提供功能上的便利。到目前为止还不清楚导入的细胞是否能提供适量的产物。

展望未来，更多的细胞替代治疗途径或许会出现。其中一个可能就是找到能够进入细胞内的小分子来取代外源基因导入细胞内，又或许能在成体器官内找到越来越多的自然分裂的细胞群体，并且这些细胞能在体外被培养与扩增，然后用于移植。未来的研究方向，至少在我们看来，应该锁定在“单一多能性”或者“寡多能性”（只能产生一种或几种细胞类型）的研究上，即使不是多能性（能分化成三胚层的细胞的能力），也绝不应该是全能性（能分化成所有胚胎和胚胎外细胞类型的能力）（图5）。以此类推，我们更愿意做到通过转换与所需细胞类型相近的一种正常细胞来产生所需的细胞类型，而不是将细胞先转变成全能性的状态再慢慢的从一个很大的范围来缩小它们的分化道路。如果仅是为了达到细胞替换治疗的目的，全能性或者生殖系传递能力都不是必需的标准或者目标。如果仅从治疗的角度看，一个具有一定分化能力，但是这种分化能力并非无限制的状态可能更为安全和有效。

文献来源：J. B. Gurdon and D. A. Melton (2008), Nuclear Reprogramming in Cells, *Science*, 322(5909):1811-5





# 信号转导

- ◎ **Primer Array**：检测样品中信号转导途径的激活情况。
- ◎ **OmicsLink™ ORF克隆**：组成型表达蛋白，激活信号转导途径。
- ◎ **OmicsLink™ shRNA克隆**：敲减基因表达，抑制级联信号途径。

**GeneCopoeia™**  
Expressway to Discovery

**GeneCopoeia, Inc.**  
Tel: 301-515-6982 (USA)  
Fax: 301-515-6983 (USA)  
Web: <http://www.genecopoeia.com>

**复能基因**  
FulenGen

广州复能基因有限公司  
电话: (020) 32052376, 32052410, 32290874  
传真: (020) 32052877  
公司网址: <http://www.fulengen.com>