

使用了一组核心的转录因子。涉及到这个过程的关键步骤有：所采用重编程因子和分子的选择、运送系统、靶细胞类型的选择以及重编程因子表达参数、培养条件、细胞识别方法、多能性鉴定的分析方法。为了更好利用丰富的新信息，有必要对重编程过程中的某些参数进行标准化，比如重编程效率的计算和多能性状态的量化。出于同样的目的，这篇综述试图对目前分离iPSCs可用到的技术做一个全面的比

较，并提出减少独立实验间变异性的标准，从而提供一个辅助设计，一个指导将来实验工作的框架，以及评价现存的iPSC文献。

文献来源：Nimet Maheraland Konrad Hochedlinger (2008), Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 3(6):595-605.



GIBH干细胞与癌症研究组/编译

## 四、转录因子调控多能性和重编程

从病毒到人类，所有活的生物体都依靠转录机制表达基因组的特定部分，来应对环境或发育信号的改变，以此执行生命周期中的关键生物功能。因此，转录构成了一个调节生物过程的关键步骤，而且转录因子被认为是决定细胞命运的主开关。近年来，干细胞生物学的迅速发展，主要得益于若干转录因子功能的阐明，转录因子是干细胞多能性的主要调节者。转录因子Oct4、Sox2、Nanog、Klf4和Myc已被证明具有将成体细胞重编程为具有多能性的细胞的神奇的力量。尽管充满实践和理论问题，这仍然是一个了不起的成就。本篇综述总结了关于多能性和重编程的最新进展，并重点阐述了关键的转录因子和重编程的可能机制。

转录因子往往与辅助因子和修饰分子采取一致行动来为响应发育或环境信号来打开或关闭下游基因的表达。因此，大量的转录因子已被证明在发育过程中主要通过控制细胞类型特异性基因的表达，从而指定细胞的命运。ES细胞是研究细胞分化和相关转录因子生化分析的良好模型系统。

1981年，埃文斯和考夫曼，以及马丁第一次从小鼠囊胚的内细胞团中分离出胚胎干细胞。他们设计出一些方法让这种细胞能无限增

殖，使这些细胞具有多能性，因为它们可以在重新引入小鼠囊胚时形成嵌合体，并有助于形成包括生殖腺在内的所有组织。这项技术突破带来了利用同源重组的ES细胞产生基因敲除动物的基因打靶技术。1998年，Thomson等成功地分离出人类胚胎干细胞，这是一个具有划时代意义的突破，意味着干细胞技术可能最终造福于人类疾病的治疗。

干细胞研究在过去十年内已经开始渗透到生物学和医学的许多学科中，这一趋势可能会继续，并冠以干细胞研究生物医学研究中心的称号。首先，包括胚胎干细胞和成体干细胞在内的干细胞，是再生医学的主角。再生科学被视为继药物治疗和外科手术后的第三代治疗方法。骨髓移植，通过更换病变的或有缺陷的造血干细胞，已经成功地治疗了多种疾病。第二，干细胞，尤其是胚胎干细胞，是基础研究领域如信号转导、发育和表观遗传学的理想模型。最后，干细胞可以成为药物筛选和安全评估的有用工具。尽管干细胞研究为我们带来了许多惊喜，但我们仍处于探索干细胞的早期阶段，包括干细胞在发育、疾病和再生等方面的分子水平机制我们仍然还不清楚。

最新的关于调控胚胎干细胞多能性的分子机制的进展提供了一些关于转录因子如Oct4

和Nanog在维持胚胎干细胞的未分化状态方面的知识。值得注意的是，已有证据表明，这些多能性因子如Oct4、Sox2和Nanog，同样参与将分化细胞重编程回多能性状态的过程。这篇综述将试图在转录因子的背景下解释多能性和重编程，并讨论有关的机遇和挑战。

## ► 1. 基本概念 ◀

多能性是所有胚胎干细胞最重要的性质，它指的是胚胎干细胞能够产生体内任何类型的细胞。在发育上，受精卵具有全能性，能够产生所有类型的细胞，包括滋养外胚层。经过多次细胞分裂，受精卵发育成囊胚，其中的内细胞团可以分离并培养成胚胎干细胞。因此，胚胎干细胞在发育上停留在多能性阶段，同时可以在体外无限繁殖。虽然在全能性上不如受精卵，胚胎干细胞已被实验证明能够产生除小鼠滋养外胚层外的所有类型的细胞。利用失活的Sox2，我们已经证明，ES细胞可以分化成滋养外胚层样细胞。因此，胚胎干细胞似乎有可能产生所有细胞类型。但是，胚胎干细胞通常被描述为多能，而不是全能，这说明，任何动物都不能由胚胎干细胞单独产生。

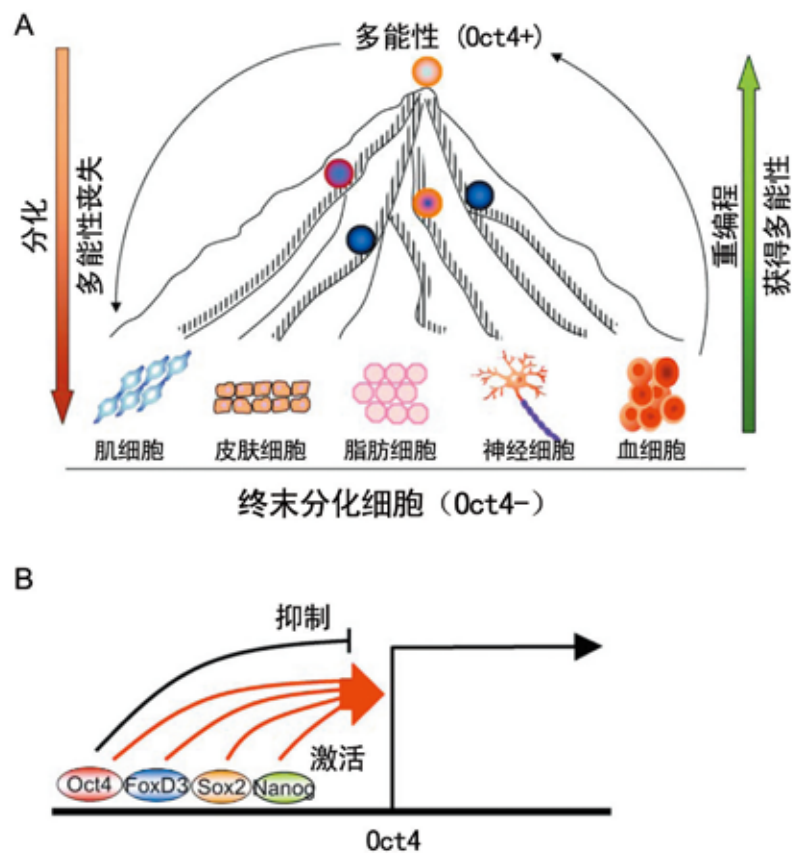


图11 干细胞多能性。(A) 干细胞生物学的三个重点——自我更新、分化和重新编程，罗列在这里展示他们的多能性关系。多能性干细胞可以被看作是处于顶端，准备自发分化成各种细胞类型的组织和器官(下)。多能性的维持通过保持Oct4表达的最佳水平来实现自我更新。多能干细胞失去多能性和激活分化相关的基因分化变成具体细胞系。分化的体细胞重新恢复多能性状态(右)。(B) 多种因素参与了维持胚胎干细胞的Oct4表达。

多能性可通过实验证实，通常检查多能性是通过将细胞注入囊胚来判断是否进行胚胎发育和产生嵌合动物，对小鼠胚胎干细胞来说这已经是常规操作。人或灵长类动物胚胎干细胞的多能性则通过畸胎瘤评估，畸胎瘤是将胚胎干细胞移植到患有严重联合免疫缺陷的小鼠或裸鼠后所形成的，包括三个胚层的不同组织。其它测试包括：体外培养产生拟胚体；检测代表三个胚层的分子标记等。此外，胚胎干细胞在特定操作方案下可以分化成特定的细胞系，如肌肉或神经元。因此，胚胎干细胞的分化潜能可以在体外和体内被实验证明。

多能性，是依靠自我更新的过程来维持的：自我更新使胚胎干细胞可以复制自己而又不失去分化的能力，从而保持多能性。这可以通过对称和非对称细胞分裂的过程实现。在体外，胚胎干细胞通过对称分裂进行自我更新；在体内，往往组织干细胞自我更新通过不对称分裂产生一个完全拷贝和另一个分化细胞。

在实验中，胚胎干细胞必须在特定条件下生长以保持多能性状态。小鼠胚胎干细胞需要培养在一层饲养层细胞上，该饲养层细胞大概

向胚胎干细胞提供了一些未知的因子。此外，LIF或其它细胞因子也需要经常补充，以防止胚胎干细胞进行自发性分化。自发性分化是在日常ES细胞培养时遇到的基本问题。人类胚胎干细胞似乎有不同的细胞因子要求。人类胚胎干细胞需要成纤维细胞生长因子以防止分化，去除饲养层细胞或细胞因子均会导致自发分化和多能性的丧失。

分化是多能性表现的过程，如由胚胎干细胞生成人体的所有220个左右的细胞类型。分化过程中，干细胞选择一个细胞谱系之后，同时也失去分化到其余细胞谱系的能力。

重编程是将分化的细胞转换回多能性细胞，有效地逆转分化的过程。在实验上，重编程已经通过体细胞核移植（克隆）进行了验证。最近，诱导多能性干细胞技术也完成了相同的壮举，通过向成体细胞引入包括Oct4和Sox2的多能性因子使其逆转到一个多能性阶段（见下文）。总而言之，自我更新、分化和重编程可以被看作是三个不同的方面，即多能性的维护、表现和获取（图11A）。

## ▶ 2. 控制干细胞多能性的转录因子 ◀

*oct4*是第一个被确定为多能性主要调节者的基因。Nichols等人表明，*oct4*缺陷的胚胎能够发育至囊胚阶段，但内细胞团细胞并不具有多能性。事实上，*oct4*最初是Scholer等发现的。它是小鼠八聚体基序结合蛋白家族的一个成员，这种八聚体基序是一种在许多基因启动子和增强子中发现的转录调控元件。Oct4的表达谱表明，它可能调节细胞早期发育的命运。生化上，Oct4已被证明是一种DNA结合蛋白，具有一个由324个氨基酸的开放阅读框编码的双边POU/同源域。Oct4依赖于在DNA结合结构域侧翼的两个反向激活结构域来发挥其转录活性。Oct4蛋白在细胞质中合成，通过一个典型的核定位信号运送到细胞核。该核定位信号

是其转录活性所需的，其消除导致产生一个负显性形式的Oct4，这个负显性形式Oct4能够通过干扰野生型Oct4活动诱导胚胎干细胞分化。

在胚胎干细胞，Oct4似乎以剂量依赖性的方式调节细胞命运。使用条件表达和抑制系统，Niwa等表明，Oct4的活动水平指定了胚胎干细胞的三个不同的命运：1) 表达量增加2倍将会使ES细胞转化为原始内胚层和中胚层；2) 抑制*oct4*会诱导滋养外胚层的形成；3) 只有一个最佳数量的Oct3/4可维持干细胞自我更新。这些结果表明，胚胎干细胞拥有一个形成网络的调节机制来保持Oct4表达处于最佳水平，从而确保多能性。

有多少转录因子参与调节*oct4*表达呢？

这一问题几个研究组根据*oct4*必须保持在一个狭窄的表达水平范围内以确保干细胞多能性这一看法所提出的。**Nanog**的发现提供了一个明确的*Oct4*调节候选者。根据Tir Nanog的名字命名的**Nanog**，被发现具有在缺乏白血病抑制因子（LIF）的情况维持干细胞自我更新的能力。虽然最初认为**Nanog**是通过抑制分化基因表达，进而实现在没有LIF情况下阻止胚胎干细胞的分化，但一个简单的报告基因分析表明，**Nanog**拥有两个强大的转录激活子，这暗示**Nanog**可能激活*oct4*表达。事实上，对于*oct4*启动子，**Nanog**是一个强有力的激活子，并由此参与调节胚胎干细胞*oct4*的表达（图11B）。

**Sox2**往往与**Oct4**一起调节基因的表达，例如**Oct4**、**Sox2**还参与了**Fgf4**表达的调节。基因敲除实验表明：**Sox2**是上胚层和胚外胚层形成所必需的，这表明**Sox2**和**Oct4**共同参与指定胚胎着床时多能干细胞的命运。最近的实验结果表明，**Sox2**对于调节多个影响**Oct4**表达的转录因子是必要的，以此维持必要水平的**Oct4**表达并稳定胚胎干细胞的多能性状态。

**Forkhead**转录因子家族的一名成员，**FoxD3**也激活*oct4*表达。**FoxD3**是囊胚期上胚层和小鼠多能性干细胞形成所需要的。虽然

**FoxD3**<sup>-/-</sup>囊胚也表达**Oct4**，但**FoxD3**似乎能够以序列特异性的方式激活*oct4*的启动子。

**Oct4**过表达时也会抑制自身的表达。因为**Nanog**、**Sox2**和**FoxD3**这些*oct4*表达的激活子的存在，使得像文献报道的那样使其表达水平保持在最佳水平变得很困难。显然，一个能平衡这些激活因子作用的办法，是**Oct4**过表达时抑制自己的启动子。另外，将来可能发现更多的抑制子来提供抑制力以维持*oct4*在胚胎干细胞的表达水平。

**Oct4**、**Sox2**和**Nanog**能够靶向调节重叠的基因。通过在人类胚胎干细胞采用全基因组定位分析的方法，**Boyer**等确定了三个核心转录因子**Oct4**、**Sox2**和**Nanog**的潜在靶标。有趣的是，他们发现，**Oct4**、**Sox2**和**Nanog**共同占据了这些靶标中的很大一部分，其中包括许多发育上重要的同源蛋白。基于这些大型数据分析，**Boyer**等提出，**Oct4**、**Sox2**和**Nanog**协作形成自调节和反馈循环组成的调控环路，以此推动多能性和自我更新。其他小组也试图通过类似的高通量技术方法探明这些网络，而且提出了更详细的机制。然而，将需要更详细的分析去验证所提议的机制和划定这些网络调控路径。

### ▶ 3. 通过转录因子重编程 ◀

阐明控制多能性的分子网络的目标之一，是恢复发育和分化期间丢失的多能性，这就需要扭转从受精卵到发育成熟个体的发育过程。直到成功克隆多利羊之前，普遍认为分化进程对较高等的哺乳动物来说是不可逆转的。克隆实验表明，体细胞可以通过未受精卵子的细胞因子重新回到全能性的合子状态。自此之后，科学家们花费了大量的时间和精力用于确定这些负责重编程的未知因子。**Takahashi**和**Yamanaka**通过候选基因的方法超越了这一障碍。通过分析在胚胎干细胞中高表达的基因，一组由24个基因组成的基因库通过逆转录病毒

被转导到成纤维细胞中去进行重编程。为了提高其成功的机会，一个在胚胎干细胞特异性表达的基因——*fbx15*，由其驱动的选择标记通过基因打靶被转入受体细胞。令人兴奋的是，类ES样克隆在2周后出现。最终，只需4个基因：*oct4*、*sox2*、*klf4*和*myc*基因，就足以将成纤维细胞重编程成胚胎干细胞样细胞。这些胚胎干细胞样细胞，主要用来区别从胚泡分离得到的多能胚胎干细胞，后来命名为诱导多能性干细胞（iPSC）。这四个神奇的因子能够夺回分化过程中失去的多能性，通过这个过程我们建立了一个理解多能性的新模式。因为对



于许多假说所驱动的研究来说iPS过程非常实用，所以重编程相关的分子机制现在可以更详细地被剖析。这个精致的iPS方法为干细胞和再生医学开辟了一个新时代。

iPS介导的体细胞重编程消除了一些治疗性克隆和使用人类卵细胞产生病人特异性的多能性细胞的伦理和技术障碍。事实上，各种病人特异的多能性干细胞的研究成果出现得越来越快。这些iPS细胞有可能成为我们了解与某一特定疾病相关机制的重要模型。但是，由于在iPS过程中利用病毒转导致癌基因，这些病人的特异性多能干细胞对于治疗是不安全的。许多实验室正在努力寻找能够在功能上取代这四个重编程因子的小分子化合物。由于Oct4、Sox2、Myc和Klf4调控着具体的信号通路，因此化学小分子调节剂的组合重编程体细胞也是可以想像的。化学方法或化学iPS，最终可能会为治疗和再生医学产生可供临床使用的多能性干细胞。

## ► 4. 未来面临的机会和挑战 ◀

iPS仅仅出现了两年，便已在提高效率和应用到各种模式生物上取得了很大进展。也有一些研究主要通过高通量技术试图了解重编程过程中的机制。然而，我们对iPS为何产生仍然知之甚少。

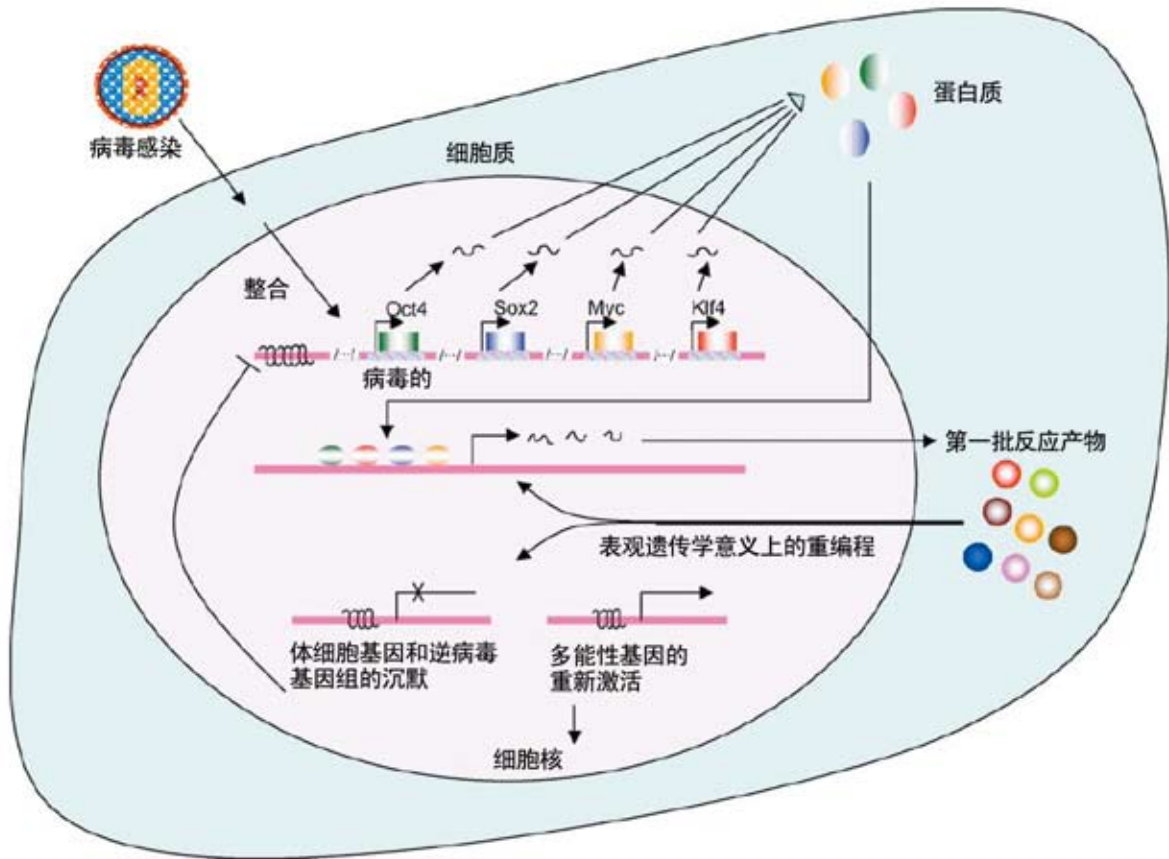


图12 参与通过Oct4/Sox2/Klf4/Myc将体细胞重编程到多能性干细胞的机理步骤。

iPS重编程主要包括以下主要步骤（图12）。首先，携带有Oct4、Sox2、Klf4和Myc的重组病毒进入体细胞，并插入宿主的基因组。这些基因在病毒所带有的启动子的驱动下转录，在细胞质中翻译成这4种蛋白，然后进入细胞核启动其所能启动的第一批基因。然后，这些初始反应基因通过组蛋白修饰系统和DNA甲基化系统参与表观遗传学机制来重塑染色质。在这个过程中，对于多能性至关重要的基因必须被转录因子打开，并通过染色质重塑来保持这种打开状态。相反，负责分化的基因则必须被转录机制关闭，并通过表观遗传学机制保持沉默。iPS过程的一个显著特点是，带有重编程发起者Oct4、Sox2、Klf4和Myc的整合基因组的原病毒会在重编程完成后被沉默。因此，iPS细胞与来源于囊胚的胚胎干细胞在功能上难以分辨。

我们应该仔细研究所有这些机理步骤，以取得重编程过程的重要信息。生物化学家们可以选择将注意力集中在iPS过程中的两个关键事件上：转录激活/抑制和表观遗传学重塑。由于Oct4、Sox2、Myc和Klf4都是已知的转录因子，其作用方式现在需要进一步的调查。举例来说，他们如何与其它辅助激活子和聚合酶II复合体协同合作来打开和关闭他们的靶标基因？现在有足够的资料说明这些蛋白质如何接触DNA并参与转录机制。根据这四个基因协同工作的要求，了解它们如何在染色质上相互协调并决定哪些基因开启和关闭显得非常重要。与研究单个启动子和转录因子不同，iPS涉及多个转录因子和整个基因组。因此，可能需要新工具来深入探讨iPS重编程中相关的转录和表观遗传学过程。

文献来源：Duanqing Pei (2009), Regulation of Pluripotency and Reprogramming by Transcription Factors, *J Biol Chem.* 284(6):3365-9



GIBH干细胞与癌症研究组/编译

## 五、诱导性多能干细胞的临床应用

要把人多能干细胞（human pluripotent stem cell）应用到临床细胞疗法当中，还需要先进行一系列标准化的检测，对其稳定性（stability）、均一性（consistency）、致瘤性（tumorigenicity）、毒性（toxicity）和免疫原性（immunogenicity）等指标进行详细的评估。

在医疗领域，干细胞疗法可以说是最具发展潜力的一项疗法，有很多公司和研究机构已经开始了这方面的研究和开发。不过基于成体干细胞（adult stem cell）的疗法已经在临床上开展了几十年，早在1968年，我们就成功的进行了第一例骨髓移植手术。随着各种细胞疗法（cell therapies）技术的进步，各种监测手段也在不断发展。目前，美国食品与药品监督管理局（US Food and Drug Administration, FDA）使用《良好组织规范管理条例》（Good Tissue Practices Final Rule）来管理细胞疗法相关产品。该条例基于各种细胞产品的风险等级，按照等级

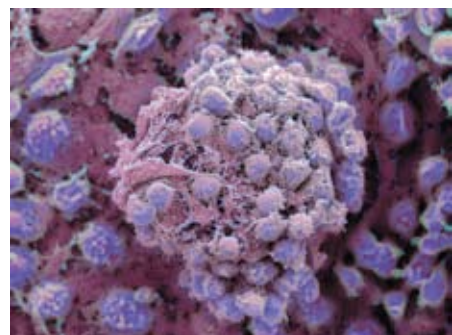


图13 图中所示的是在今年早些时候刚刚获得FDA批准，可以用于临床实验的来源于人胚胎干细胞的细胞产品相关图片。