

## (二) iPS细胞在人类疾病研究工作中的作用

借助iPS细胞技术人们可以制备出各种各样用途广泛的具有患者特异性的或者疾病病种特异性的人体细胞。虽然现在还存在一些技术难点，但是该研究领域的进展一定会在我们攻克各种人类顽疾的征途上给予极大的帮助。

长久以来，能够获得大量与患者个人遗传背景相匹配的细胞一直都是再生医学领域的一大梦想。因为取自患者本人的细胞系一点也不会影响治疗，而且还有可能为该病种构建体外模型提供基础研究所需要的材料。在培养皿中培养这些携带疾病基因型的细胞，重建整个病理过程并用这些细胞构建体外疾病模型，这一整套研究方法能帮助我们了解疾病背后的分子机制，还能为药物研发提供很好的研究及筛选材料。

### 1. iPS细胞技术的出现彻底改变了人类疾病的建模工作

多年来，体细胞核转移（SCNT）技术一直都被认为是制备患者个人特异性细胞系的不二选择，因为我们曾经借助SCNT技术成功获得了克隆动物多莉羊。不过在多莉羊出生后的第15年，在利用SCNT技术成功获得小鼠胚胎干细胞后第10年的今天，我们还是无法利用SCNT技术获得人体胚胎干细胞（hESC）。而且要获得人体卵细胞还将面临伦理道德问题和实际工作的困难，这也是阻碍人体SCNT研究发展的一大障碍。要获得hESC还有一个更加实际的办法，那就是用植入前遗传诊断技术（文后小词典）筛选出携带疾病遗传表型的胚胎，然后再从这些胚胎中筛选出hESC。我们已经利用这种PGD-hESC技术获得了一些具有遗传疾病特异性的hESC，不过我们几乎没能利用这些细胞成功构建出疾病模型。制备PGD-hESC细胞需要在人体胚胎早期就进行筛选，现在这种细胞只能用于可被PGD技术筛选出来的疾病研究工作当中，因此我们还需要更为专业的筛选技术和hESC制备技术。

诱导多潜能干细胞（iPS细胞）技术的出现彻底改变了人类疾病的建模工作。日本科学家Shinya Yamanaka发明的这种iPS细胞技术能让体细胞重编程为多潜能干细胞样细胞，而且制备方法简单，只需要将几个关键的与细胞多潜能状态有关的转录因子转入体细胞并使其过表达就可以了。自从报道了第一例来源于小鼠的iPS细胞以来，这个研究领域就一直以极其迅猛的速度发展，并解决了很多有关iPS细胞多潜能状态的问题。

研究发现，小鼠iPS细胞能够以形成嵌合体后代的方式形成生殖细胞，而且能够在四倍体胚胎互补实验中发育成为完全由iPS细胞发育而来的完整子代小鼠。有关人体iPS细胞的研究也获得了飞速的发展，很多问题都很快得到了解决。几年前还很难获得的患者特异性和疾病特异性细胞到现在已经不再是什么难事了，在很多实验室这甚至已经成为了常规操作项目。

### 2. 构建疾病模型：我们该站在何处？

虽然iPS技术还有很多地方需要完善，但它已经在构建疾病模型方面显露出明显的优势。

不过，目前最需要优先解决的问题是如何避免外源性转入基因插入宿主细胞基因组（图1）。在iPS细胞构建疾病模型方面开展得最早的一项研究只是简单证明了使用iPS技术能够获得疾病特异性的iPS细胞，同时也构建了一些病种特异性的iPS细胞。获得了这些具有疾病特异性的iPS细胞之后，接下来的工作就是将这些细胞分化成在发病过程中相应的受累细胞系。比如源自缓慢进展型肌萎缩性脊髓侧索硬化（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）患者的iPS细胞分化出的脊髓运动神经元细胞和源自七名散发帕金森综合症（sporadic Parkinson's disease）患者的iPS细胞分化出的多巴胺能神经元细胞等等。

这些早期的研究工作既没有尝试对细胞开展任何与疾病表型相关的鉴定工作，也没有发现任何与疾病有关的表型。不过，最近开展的一些研究已经开始从事这方面的工作了，他们希望利用这些细胞在体外构建疾病模型来研究发病机理，同时也可以利用这些模型进行药物筛选。

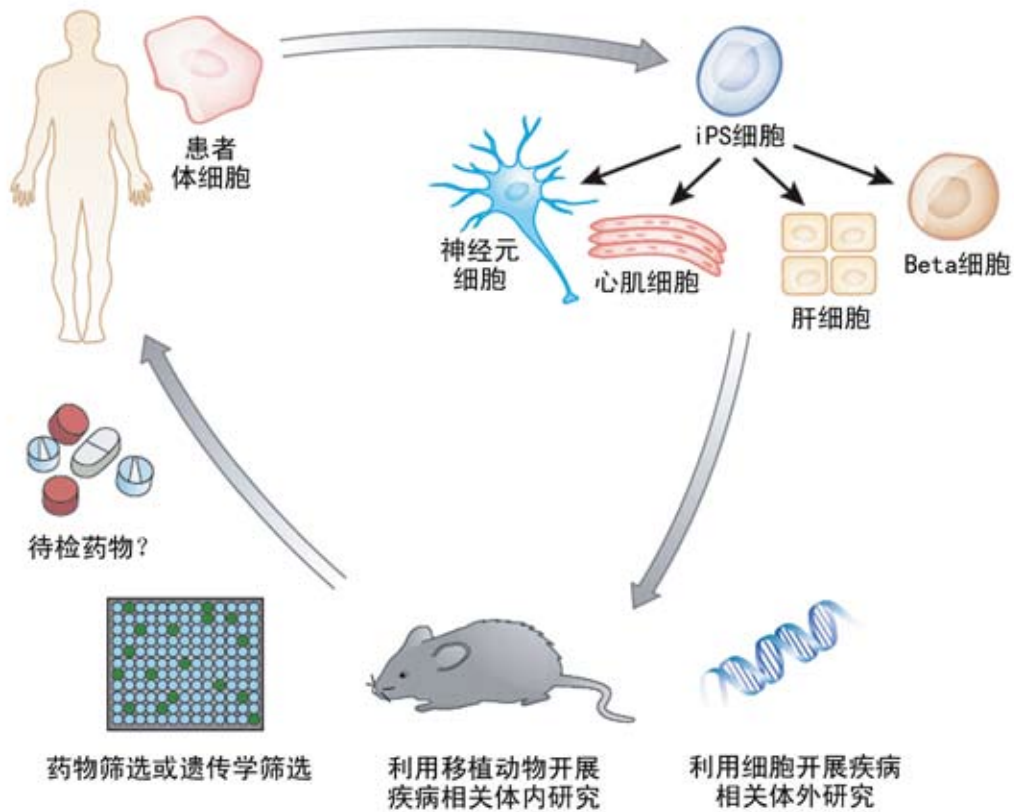


图1 iPS细胞在人类疾病研究工作中的用途。  
图片由《自然-医学》（*Nature Medicine*）杂志提供。

一项早期的研究报道称从一名3岁的脊髓性肌萎缩（spinal muscular atrophy, SMA，该疾病是一种发病年龄很早的运动神经紊乱性疾病）患儿细胞重编程获得的iPS细胞分化得到了具有SMA疾病表型的运动神经元细胞，即SMA-iPSC。该研究报道称从SMA-iPSC分化获得了完整的运动神经元细胞，但是该细胞的存活能力不强。这种具有SMA疾病特异性iPS细胞来源的运动神经元细胞内SMN蛋白的表达水平降低，缺乏包含SMN蛋白的核内聚集体结构——gem。

研究还发现，如果给这些细胞使用丙戊酸（valproic acid）或妥布霉素（tobramycin）等已经在小鼠SMA动物模型中证实能够上调SMN蛋白表达水平的药物，细胞内SMN蛋白的表达水平也能得到极大的提高，而且gem的数量也有明显增多。

Gabsang Lee和Lorenz Studer也利用iPS细胞从事了疾病建模方面的工作。他们感兴趣的疾病是家族性植物神经功能障碍症（familial dysautonomia, FD）——一种罕见的主要影响末梢神经系统的遗传性疾病。家族性植物神经功能障碍症的预后很差，只有40%的患者能够活过20岁。大多数患者都只是因为IKBKAP基因（又名ELP1基因，该基因编码产物能参与形成转录延伸复合体）发生了一个点突变导致基因发生部分错误剪接而致病。他们从3名年龄分别为10岁、12岁和16岁的FD患儿体内获得了iPS细胞，即FD-iPSC，然后将这些细胞诱导分化，构建了体外FD模型。与患者体内的情况一样，由这些FD-iPSC分化而来的神经管嵴前体细胞（neural crest precursor cell）内正常IKBKAP基因转录体的丰度要比其它组织细胞中的低得多。而且他们还在多个FD-iPSC克隆中发现了其它两个与FD疾病相关的表型，即神经发生缺陷（neurogenesis defect）表型和细胞运动性缺陷（defect in cell motility）表型。此外，他们还发现植物激素kinetin能够明显改善IKBKAP基因的剪接过程，部分改善神经发生缺陷的情况。

上述SMA和FD疾病的相关研究都表明，利用iPS细胞分化得来的细胞在体外构建病理模型是完全可行的（图2）。不过非常有意思的是，这些研究都不约而同地具有一些共性，比如研究的疾病都是发病时间很早的疾病，都是很容易检测到遗传缺陷的疾病，被研究的细胞都很容易利用hESC直接分化获得等等。文章后面也会提到，这种发病时间较早、遗传背景清楚的疾病尤其适合利用iPS细胞技术进行研究。同时，在造血系统紊乱疾病的建模方面也取得了一些初步进展。值得一提的是，从骨髓增生紊乱（myeloproliferative disorder）患者制得的iPS细胞直接分化而来的细胞会表现出红细胞增多的现象。



图2 利用iPS细胞构建人类疾病模型方法的模式图。图中红色、绿色和蓝色表示神经元细胞，这些细胞是由家族性植物神经功能障碍症特异性iPS细胞分化而来。本图由Lorenz Studer提供。

### 3. 目前面临的问题

本文前面已经介绍了iPS细胞技术对于疾病建模工作可能会带来的各种好处，下文还将介绍目前在这方面可能会遇到的，而又必须要解决的一些问题。其中的一个中心问题就是iPS细胞状态的本质究竟是什么，iPS细胞能等同于hESC吗？很明显，这个问题也是干细胞基础生物学领域的主要问题，而干细胞研究领域也与疾病建模工作有着紧密的联系。细胞存在着各种不同的多能细胞状态，这也意味着某个细胞系的分化能力可能是偏差的，或者说明与疾病相关的细胞类型的表现特征可能

会与hESC分化而来的细胞的特征有所差异。因此在这个阶段我们就应该对iPS细胞模型和PGD-hESC或者hESC模型进行非常仔细的比较。

在iPS细胞建模方面有一个非常基础性的问题就是信噪比问题，或者说如何能够确保筛选出来的细胞会一直表现出与疾病相关的表型。这里所说的“噪声”可能会由多种原因导致，比如遗传背景因素，因此必须在试验中设置一个遗传背景合适的对照细胞系；再比如iPS细胞系本身多向分化能力方面的差异，即重编程过程可能不完全因素等等。但是其中最重要的因素还是细胞在定向分化过程中出现的异质性问题。这个问题与人体胚胎干细胞的特性有关，因此我们需要进一步改进细胞定向分化的操作流程，并且使之标准化。而且我们还需要制定一套标准，来对已分化细胞的各种指标进行评判，这样才能对各个实验室的实验结果进行规范和比对。其中很重要的一项指标就是细胞表面分子标志物和遗传报告因子。我们可以借此“纯化”出与疾病相关的细胞系，从而极大地减少iPS细胞研究中的各种可变因素。

能够获得这种纯化的细胞对于研究发病过程中细胞自发作用和非细胞自发作用之间的差异也至关重要。比如我们曾利用SOD1基因发生突变的ALS患者的iPS细胞进行了一次非常有意义的研究。因为在小鼠模型中发现，SOD1基因发生突变的星状细胞（astrocytes）能以非细胞自发作用的方式促进运动神经元死亡，而这正是ALS疾病的特征。因此，如果要弄清楚ALS-iPSC自发缺陷和非细胞自发缺陷的作用，我们首先需要得到纯化的疾病特异性运动神经元细胞和疾病特异性的星状细胞，以及各自的对照细胞。

各种遗传技术的迅猛发展一定会带动分子标志物的发展和谱系特异性iPS细胞纯化技术的发展。这些科技进展既可以帮助我们修复致病性的遗传突变，也可以进行上位性遗传研究（genetic epistasis study），发现与疾病相关的信号通路。比如最近的研究表明，在诱导形成iPS细胞以前可以用慢病毒基因转移技术对范可尼贫血（Fanconi-anemia）特异性的成纤维细胞进行改造，从而纠正致病的“错误”基因。不过这种方法存在一定问题，因为范可尼贫血对基因剂量效应非常敏感，而且还对基因有特别苛刻的细胞类别特异性表达要求，这都是很难通过转基因技术实现的。面对这种情况最有可能奏效的办法就是同源重组技术（homologous recombination）。虽然我们还没有在疾病特异性iPS细胞中修复点突变的成功先例，但是随着锌指核酶或腺病毒伴随病毒介导重组（adeno-associated virus-mediated recombination）等技术的发展，实现对iPS细胞的修复只是时间早晚问题。实际上，将来对于很多研究来说，修复遗传缺陷以及重建iPS细胞的疾病表型都将是构建体外疾病模型所必须完成的工作。

最后，对于构建疾病模型来说，还有一项需要考虑的因素那就是由iPS细胞分化而来的细胞和组织的“年龄”。Yamanaka的研究表明，从某种意义上来说，细胞的“年龄”是可以经由重编程过程而发生逆转的。但矛盾的是，在如今的iPS细胞研究领域中最棘手的一大问题就是如何“拨快”年龄开关，诱导iPS细胞分化成为我们所需要的细胞，比如70岁的阿尔茨海默病患者或帕金森氏症患者的神经元细胞。与阿尔茨海默病或者帕金森氏症一样，有很多人类疾病的发病年龄都比较晚，但是现有的hESC和iPS细胞分化技术都只能得到非常“年轻”的细胞，这些细胞只能表现出胎儿细胞的特征。比如由hESC分化而来的心肌前体细胞所表现出来的生理学特征就与早产儿的心肌前体细胞一样。由hESC分化而来的多巴胺能神经元细胞还必须经过长时间的成熟过程才能表现出真正的功能，比如用于治疗帕金森氏症患者。而由hESC分化而来的胰岛样细胞会缺乏应有的葡萄糖反应性，这也与早期的胎儿细胞非常相似。所有这些现象都让我们产生了疑问，使用传统的细胞分化技术能否构建出那些发病时间较晚的疾病模型呢？是否还需要发展其它的新技术，从而在体外构建出“高龄”细胞呢？目前大家的主要工作包括采用各种

办法刺激iPS细胞分化细胞使其表现出“高龄”疾病的一些表型，这些方法包括使用自由基刺激（free radical exposure）、环境毒物（environmental toxins）刺激、或者胞内过表达一些能够促使毒物聚集的蛋白质等等。还有一个有趣的问题——iPS细胞是否会有记忆以保持它的“原本年龄”，一旦如此，那么构建老年性疾病模型就会容易得多。另外，用在实验动物体内植入人iPS细胞的办法来构建人—兽种间嵌合体生物，这样能够长期观察这些iPS细胞在成年活体生物体内的表现。不过我们首先还需要弄清楚宿主体内的环境因素是否足以诱发iPS细胞表现出我们期望的“老年样”表型。要想好好利用iPS细胞技术来构建疾病模型首先还需要深入了解有哪些因素能够决定细胞的年龄，这些因素包括细胞内在因素和外在环境的各种因素。

## 4. iPS细胞能带领我们走向个性化医疗吗？

我们对很多人体疾病都知之甚少，这是因为很多人体疾病的病因都非常复杂，包含遗传和环境等众多致病因素。iPS细胞技术究竟只适用于遗传背景清楚的疾病，还是可以用于散发的、遗传背景不明的疾病？这是一个非常关键的问题。有一个方法可以弄清iPS细胞技术对于散发疾病的应用价值。首先，从来自同一疾病患者群的iPS细胞中找出所有可能的与该疾病相关的细胞表型。然后就可以根据这些表型对该疾病进行更为细致的分类。同时对这些iPS细胞开展平行研究，就能将这些细胞表型和该疾病的遗传型一一对应。这种针对同一疾病的不同亚类开展遗传研究的方式最终可以找出疾病相关的遗传位点，因此也能发现针对其中某一亚型疾病的特效药物。

只有经过时间检验才能够知道使用iPS细胞构建的疾病模型和传统的小鼠疾病模型孰优孰劣。虽然小鼠模型的表现一直都非常出色，但还是有一些人体疾病无法用小鼠模型来真实地加以复制。比如我们就没能成功地在小鼠身上复制出家族性植物神经功能障碍症模型，因为缺乏IKBKAP蛋白功能的小鼠胚胎在发育早期就会死亡。而如果使用携带有人FD突变基因的BAC拯救该基因无义突变表型（null phenotype）小鼠则只能得到正常的小鼠。此时，FD-iPSC模型成为了我们唯一的希望。不过缺乏合适的动物模型始终都是一个缺憾，因为这同样会对iPSC模型研究带来不便。没有合适的动物模型，就很难对基于iPSC模型得到的结果进行验证。

iPS细胞技术仍然在不断发展，还有很多问题需要我们去解决。该技术能够用于构建人类疾病模型，为人类疾病研究出力，也能促进个性化医疗时代的早日来临。可以相信，iPS细胞技术最终必将成为临床上的一项常规技术，人们既可以通过它来获取患者的完整遗传信息，也可以直接制备出患者个人的组织器官，还可以在用药前先利用iPS细胞对药物进行筛选和检测，也能利用iPS细胞检测患者患上某种疾病或癌症的易感性和风险性。甚至还能利用iPS细胞预测某项疾病预防措施对患者可能带来的效果，因而影响患者的生活方式。今天，上面这些设想听起来就像科幻小说里描绘的一样，但是iPS技术本身就足以证明，科技的进展往往会超出科幻小说的描写。

原文检索：

Gabsang Lee & Lorenz Studer. (2009) Induced pluripotent stem cell technology for the study of human disease. *Nature Methods*, 7(1): 25-27.

 YORK/编译

## 小词典

植入前遗传诊断技术（preimplantation genetic diagnosis, PGD）是产前诊断的最早期形式，但与产前诊断不同。PGD是在妊娠发生之前进行，因而避免了选择性流产以及随之发生的伦理道德观念的冲突。该技术在20世纪80年代末期开始应用于临床。用于PGD技术检测的遗传物质有限，仅有1~2个细胞，而且诊断有时限性，必须在子宫种植窗限制的时间内完成。另外，胚胎的嵌合型对诊断准确性有一定影响。目前的诊断技术主要包括单细胞PCR、荧光原位杂交技术以及在两者基础上衍生的新技术。

### （三）各国iPS细胞研究政策概况

iPS细胞自诞生以来，就一直是法律、伦理等诸多研究领域备受关注的一大问题。其中争议最大的就是有关人体胚胎干细胞研究方面的话题。只有更加明了法律、伦理等复杂的社会文化方面的情况，iPS细胞的研究才能更好、更长远地发展下去。

最近几年生命科学研究领域最热门的话题之一就是iPS细胞，几乎没有其它研究方向能与之媲美。iPS技术既受科学界的追捧，因为它具有非常重要的科学价值，也受普罗大众的欢迎，因为iPS技术很好地解决了以前胚胎干细胞技术所带来的不可避免的伦理道德问题。

毫无疑问，iPS技术的出现和发展是科学技术进步的一大成果，而且这一成果目前正以极快的速度不断积累壮大。不过，之前人们对人体胚胎干细胞技术（hESC）的种种质疑也对iPS技术造成了一定的影响。因此，iPS相关研究领域的科研工作者应该在不同的层面开展工作，以解决困扰胚胎研究和克隆技术的种种伦理道德问题。将来我们还将会碰到人体组织研究方面，尤其是临床应用方面的各种问题。可以预见，由于各国在有关iPS细胞等生物材料方面的法律和管理等方面的差异，科研工作者在各国间交流时以及iPS相关材料在流通时也会碰到一系列的问题。所有这些问题都会给iPS相关研究和政策制定带来麻烦。比如目前有哪些现有的法律条文或伦理指南能够指导iPS研究工作？各国的相关管理制度之间有什么明显的差别？这些差别会对iPS国际合作带来哪些影响？iPS研究领域是一个飞速发展的领域，上述这些问题如果无法得到及时有效的解决，将对科研工作带来极坏的影响。



图片说明：红色区域代表本文涉及到的国家和地区。