

# 体细胞直接转化为多能干细胞的新方法

李林凤<sup>1,2</sup>, 关伟军<sup>1</sup>, 马月辉<sup>1</sup>, 李晗<sup>1</sup>, 白秀娟<sup>2</sup>, 官雪莲<sup>1</sup>

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094

2 东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨 150000

**摘要:** 胚胎干细胞具有自我复制、高度增殖、多向分化潜能、可植入性和重建能力等特征。对于诸如青少年糖尿病、帕金森综合症和心脏病等需要通过细胞移植来治疗的疾病而言, 从人的囊胚内细胞团获得胚胎干细胞系是最理想的供体来源。然而, 目前实验和医疗还要考虑到利用人类胚胎的一些伦理问题和组织排异反应。避免这些问题的可能途径就是通过已分化体细胞的重新编程来直接转化为诱导性多能干细胞, 它们具有类似 ES 细胞的功能。目前, 获得诱导性多能干细胞的设想已初步实现了从老鼠到人的突破。以下主要对体细胞直接转化为诱导性多能干干细胞的研究现状、方法和转录因子在诱导体细胞重新编程中发挥的作用等内容进行了概述, 以期对干细胞研究者进行更深入的研究提供一定的借鉴。

**关键词:** 体细胞, 诱导性多能干细胞, 重新编程

## Direct Generation of Pluripotent Stem Cells from Differentiated Somatic Cells

Linfeng Li<sup>1,2</sup>, Weijun Guan<sup>1</sup>, Yuehui Ma<sup>1</sup>, Han Li<sup>1</sup>, Xiujuan Bai<sup>2</sup>, and Xuelian Gong<sup>1</sup>

1 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100094, China

2 College of Animal Science & Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150000, China

**Abstract:** Embryonic stem (ES) cells have the unique capacity to proliferate extensively and maintain the potential to differentiate into advanced derivatives of all three primary germ layers. ES cell lines can also be generated from human blastocyst embryos and are considered promising donor sources for cell transplantation therapies for diseases such as juvenile diabetes, Parkinson's disease, and heart failure. However, as for organ transplants, tissue rejection remains a significant concern for ES cell transplantation. Another concern is the use of human embryos. One possible means to avoid these issues is by reprogramming the nuclei of differentiated cells to ES cell-like, pluripotent cells. This review discusses the potential of these strategies to generate tailor-made pluripotent stem cells and the role of transcription factors in the reprogramming process.

**Keywords:** somatic cells, induced pluripotent stem cells, reprogramming

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES)被俗称为“万能细胞”, 从理论上讲, 可分化为人体 220 种细胞中的任何一种, 从而构成机体各种复杂的组织器官。它可以用于治疗帕金森氏症、脊髓损伤和糖尿

Received: March 17, 2008; Accepted: July 1, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30100132).

Corresponding author: Weijun Guan. Tel: +86-10-62815992; E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn

Yuehui Ma. Tel: +86-10-62813463; E-mail: Yuehui.ma@263.net

国家自然科学基金项目 (No. 30100132)资助。

病等组织器官缺损或功能障碍等多种疾病。然而,目前实验和医疗还要考虑到利用人类胚胎的一些伦理问题和移植的排异反应。假如能够直接采集到患者自身的多能性细胞,这些问题就会迎刃而解。因此,一直以来人们进行了大量研究,试图找到一种方法将已丧失分化全能性的成体细胞恢复全能性,直接转化为诱导性多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS),它们具有类似ES细胞的功能,用于临床疾病的治疗。目前,获得iPS细胞的设想已初步实现了从老鼠到人的突破。iPS所提供的新思路、新技术和新方法具有重大理论意义和实用价值。这一新的突破在理论上首次证实了已分化成熟的体细胞同样可以被重编程转化为类ES细胞,在应用上成功地避开了长期以来争论不休的伦理问题,突破了核移植技术缺乏卵母细胞的窘境,并为获得患者自身遗传背景的ES细胞增加了一个新途径。它将为干细胞和再生医学的应用提供治疗用的种子细胞;同时,也是研究发育生物学、疾病发生发展机制、基因与蛋白质功能分析等十分重要的实用模型。

## 1 iPS 实现从老鼠到人的突破

2006年7月,日本京都大学的 Shinya Yamanaka<sup>[1]</sup>选择了24种与维持胚胎干细胞亚全能分化特性相关的因子作为候选因子通过系统的排除过程,他们最终使用了4个基因 *Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *KLF4*,通过基因重新编排技术,用逆转录病毒将4个基因转入小鼠皮肤细胞中,能够将小鼠尾部的细胞转化为类ES细胞。次年6月,Shinya Yamanaka 小组<sup>[2]</sup>通过在白鼠皮肤细胞中植入与此次相同的4种基因制成了人工干细胞。这些细胞能够在体内分化为3个胚层,能够形成嵌合体小鼠,并且这些嵌合体小鼠能够杂交产生纯合后代。这一结果和真正的ES细胞只有一步之遥。但是,目前仍然需要彻底分析和了解这些诱导的多功能细胞的能力到底有多大;这些细胞如何分化成其他类型的细胞,并最终知道它们如何能够用做疾病模型和治疗工具。

2007年11月6日,我国中科院上海生科院广州生物医药与健康研究院的裴端卿领导的小组<sup>[3]</sup>率先在 *Cell Research* 上报道了运用反转录病毒将 *Oct4*、*Sox2*、*Myc* 和 *KLF4* 四个因子导入未经遗传修改的小鼠成纤维细胞,并将该类细胞去分化与重编程为类

ES细胞,即在国际上称为iPS细胞。这一研究的创新点在于利用了未经修饰并且不带有选择标记的小鼠成体细胞,探索出了直接运用iPS技术的新途径,并获取了近千分之三左右的高成功率。

2007年11月22日,日本京都大学的 Shinya Yamanaka 研究小组<sup>[4]</sup>及美国威斯康辛大学研究小组<sup>[5]</sup>通过独立研究,分别表示已成功通过人体表皮细胞制造出了类ES细胞。这一技术有望用于特定疾病的干细胞研究和治疗,来避开利用人类受精卵或卵子获得ES细胞的伦理道德争议问题。Yamanaka 研究人员使用此前的4种基因副本——*Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *KLF4*,导入方式也与此前的小鼠实验类似,只不过实现基因重组的细胞分别来自一位36岁妇女的表皮和一位69岁男性的结缔组织。利用该技术,大约每5000个细胞就能制造一个iPS细胞系,这一高效率保证他们在每项实验中都能得到数个细胞系。威斯康辛研究小组独自确定了14种新的候选重组基因通过系统的排除过程,他们最终也使用了4个基因 *Oct3/4*、*Sox2*、*Nanog* 和 *LIN28*,其中前2个和 Yamanaka 小组是相同的。Thomson 和同事利用的是胎儿皮肤细胞以及一个新生儿的包皮细胞。与 Yamanaka 小组相比,这项研究需要1万个细胞才能分离出一个iPS细胞系,但对实验而言已经足够了。利用新的重新编程技术,威斯康辛研究组发展出8个新的干细胞系,而且其中一些细胞系已经培养了22周的时间。为了确保治疗的安全性,还需要开发出能够移除病毒载体的方法。这次人体皮肤细胞“直接改造技术”跨越伦理障碍,令在实验室中培育出人造人体器官的梦想更近了一步。

2007年11月30日,Shinya Yamanaka 研究小组<sup>[6]</sup>在 *Nature Biotechnology* 上发表了改进实验结果,发现即使没有 *Myc* 转录因子的参与,也能将鼠和人的成纤维细胞重新编程为iPS细胞,与用4个转录因子诱导获得的iPS细胞相比,子代鼠的肿瘤发生率明显降低,但iPS细胞的发生率却比原来降低大约50%。今后的研究方向主要是筛选一些新的基因和小分子来替代 *Myc* 基因,这对于提高获得病人特异性iPS细胞有很重要的意义。

2008年1月10日,In-Hyun Park 等<sup>[7]</sup>研究发现,使用4种基因 *Oct4*、*Sox2*、*KLF4* 和 *Myc* 诱导来自于人胚胎干细胞的已分化成纤维细胞、早期胎儿组织

(肺、皮肤)、新生儿成纤维细胞、成体成纤维细胞和间充质干细胞,可以使他们重新程序化为多能性细胞。当我们从这4种基因中剔除掉一种基因时,发现 *Oct4* 和 *Sox2* 是诱导所必须的,而 *Myc* 和 *KLF4* 不是必须的,但他们可以提高 iPS 细胞的克隆形成率, *Oct4*、*Sox2* 和 *Myc* 或 *Oct4*、*Sox2* 和 *KLF4* 这2种组合均可以诱导人类细胞再程序化为 iPS 细胞。进一步证实 Shinya Yamanaka 研究小组和 Thomson 研究小组实验结果的可行性。同时说明诱导因子的组合有很大的灵活性,在再程序化中 *Nanog* 和 *LIN28* 只是对 *Oct4* 和 *Sox2* 的作用进行了适当的补充。

2008年4月15日, Marius Wernig 等<sup>[8]</sup>研究小组在 PNAS 上发表的最新研究结果进一步验证了 iPS 细胞的多能性。用4种基因 *Oct4*、*Sox2*、*KLF4* 和 *Myc* 诱导鼠成纤维细胞获得的 iPS 细胞在体外可以分化为有功能的神经细胞,将神经细胞植入胚胎大脑或有帕金森病的成体大脑内,均有十分显著的疗效。我国中国科学院上海生化细胞所肖磊等<sup>[9]</sup>报道了运用6种基因 *OCT4*、*NANOG*、*SOX2*、*LIN28*、*C-MYC* 和 *KLF4* 同时诱导人类已分化包皮细胞,可以明显提高获得 iPS 细胞的效率。同时发现 *C-MYC* 和 *KLF4* 两种基因可以阻止细胞凋亡或调控细胞周期,进一步证明多基因诱导可以提高基因的重新整合效率。

## 2 诱导体细胞重新编程的转录因子

国内外研究人员通过逆转录病毒介导法对体细胞进行诱导测试,最后筛选出有效的转录因子组合。每个转录因子在诱导体细胞重新编程中均发挥着重要的作用。

### 2.1 *Oct3/4*

*Oct3/4* 是 POU 家族的转录因子,由 *pou5f1* 基因编码,在早期胚胎发育中起着关键作用,所表达的蛋白质是细胞全能性的重要标志。在体内发育过程中, *Oct3/4* 限制性地表达于卵细胞、早期胚胎卵裂球、囊胚 ICM、原始外胚层和原始生殖细胞中,并随着原始生殖细胞的迁移在早期性腺中表达<sup>[10]</sup>。在体外, *Oct3/4* 只在未分化的胚胎干细胞中表达,当这些细胞向体细胞分化时, *Oct3/4* 表达下降。目前, *Oct3/4* 的功能研究已取得了一定的进展,通过基因敲除及过表达实验证明了它具有维持 ES 细胞自我

复制和促进 ES 细胞分化的双重作用:缺失 *Oct3/4* 基因的 ES 细胞将自发分化为滋养层细胞,过量表达 *Oct3/4* 基因的 ES 细胞则会向原始内胚层细胞分化。但在撤除外源性抑制因子的情况下, *Oct3/4* 并不能维持 ES 细胞的未分化状态,这说明 *Oct3/4* 不能独立维持 ES 细胞的亚全能分化特性。近年来,有研究表明 *Oct3/4* 是 ES 细胞亚全能分化特性调控网的重要组成部分<sup>[11]</sup>。 *Oct3/4* 可直接与下游基因启动子区的重复序列 AGTCAAAT 结合,从而激活或抑制该基因的转录。此外,它还可以与某些辅助因子(*ELA*、*Sox2* 和 *Rox1*)形成异源二聚体来调节下游基因(*Fgf4*、*Utf1*、*Opn*、*Zfp42/Rex1*、*ETn052* 等)的表达情况。在 ES 细胞中 *Oct3/4* 主要通过结合 *Sox2* 发挥作用。当 *Sox2* 表达降低时,即使 *Oct3/4* 表达正常, ES 细胞仍然会向胚外外胚层分化<sup>[12]</sup>。但关于 *Oct3/4* 的靶基因及其启动的相关辅助因子与结合方式等方面的研究还有待探讨。

### 2.2 同源蛋白转录因子 *Nanog*

2003年, Mitsui 等人<sup>[13]</sup>在小鼠和人的 ES 细胞中发现的一类新的内源性同源异型蛋白,命名为“*Nanog*”。在体内发育过程中, *Nanog* 主要表达于致密桑葚胚的内部细胞、囊胚 ICM、胚胎原条的上胚层及外胚层中,该表达在形成中胚层和限定性内胚层时下调。在体外, *Nanog* 仅表达于 ES 细胞、胚胎生殖细胞以及胚胎癌细胞中。 *Nanog* 基因发现时间不长,但它在 ES 细胞调控中的重要作用已得到证实,该基因可独立于 *LIF/gp130* 外,维持 ICM 和 ES 细胞的多能性。去除外源性 LIF,持续表达 *Nanog* 基因的 ES 细胞仍可保持未分化状态,而缺失 *Nanog* 基因的 ES 细胞将向体壁和脏壁内胚层分化。缺失 *Nanog* 基因的细胞高表达促分化基因 *gata4*、*gata6* 及 *Cdx2*,因此,推测 *Nanog* 对促分化基因 *gata4*、*gata6* 及 *Cdx2* 的抑制作用是它维持 ES 细胞多能性的关键。已经证明 *gata6* 可能位于 *gata4* 的上游,因为 *gata6* 的失活导致 *gata4* 表达抑制,而 *gata4* 失活则使 *gata6* 的表达增强<sup>[14]</sup>。 *gata6* 增强子区含有由 SELEX 决定的 *Nanog* 的 DNA 识别序列,提示 *Nanog* 可能直接抑制 *gata6*,因此抑制了 ES 细胞分化。另外,在 *rex1* 增强子区发现了 *Nanog* 保守序列, *Nanog* 细胞可能也调节 ES 细胞特异性基因以维持其多能性<sup>[15]</sup>。研究表明, *Nanog* 的功能依赖于 *Oot3/4* 的持

续表达<sup>[16]</sup>。*Oct3/4* 缺失的 ES 细胞仍然有 *Nanog* 表达,但不能起到维持 ES 细胞不分化的作用,因此 *Nanog* 与 *Oct3/4* 在功能上是有关联的<sup>[17]</sup>。*Oct3/4* 缺失的细胞表达 *Nanog*,但 *Nanog* 的过度表达不能使得没有 *Oct3/4* 参与的情况下出现的分化发生逆转。*Oct3/4* 对决定胚胎细胞以下两种分化归宿是必需的,1 个是在桑椹胚阶段,第 2 个是在附植前期,而 *Nanog* 对第 2 个分化归宿的决定是极其关键的<sup>[18]</sup>。*Oct3/4* 对 *Nanog* 的表达不是必需的,但 *Nanog* 离开了 *Oct3/4* 就不能发挥作用。因此,只有来自 *Nanog* 和 *Oct3/4* 信号的联合作用才能维持胚胎干细胞的自我更新和多向分化潜能。此外,最新的研究表明 *Nanog* 可通过结合 *Smad1* 来抑制 BMP 诱导的 ES 细胞分化<sup>[19]</sup>。威斯康辛研究小组<sup>[5]</sup>认为,*Nanog* 对来源于间充质细胞的胚胎干细胞克隆的恢复有促进作用,但却不是最初出现克隆所必需的。在实验中,小鼠 ES 细胞中 *Nanog* 的过量表达使得细胞重新编程的效率提高 200 倍。*Nanog* 的表达可以提高人 ES 细胞的克隆形成率,即增加了重新编程细胞的存活几率。

### 2.3 Sox2

*Sox2* 是胚胎癌细胞中表达的一个 *Sox* 家族成员之一。*Sox2* 也是胚胎发育早期多能性的一个标志基因,在内细胞团、外胚层和生殖细胞有表达。在胚胎发生中,*Sox* 基因表现出多样的动态表达模式,母体 *Sox2* 蛋白的表达一直持续到着床前的整个发育阶段。在体外,*Sox2* 基因在未分化的 ES 细胞和 EC 细胞中表达,且随着细胞分化表达下调。与 *Oct3/4* 不同,*Sox2* 也表达于多能细胞胚外外胚层。缺乏 *Sox2* 的胚胎会由于外胚层发育不良而死于着床期。纯合突变体在形态上看起来是正常的,但是胚泡在体外培养时不分化,也不能扩增,只能生成类似于细胞的滋养外胚层和内胚层。剔除掉 *Sox2* 将会导致 ES 细胞的滋养外胚层分化<sup>[20]</sup>。因此,*Sox2* 象 *Oct3/4* 一样,在维持多能性上是必需的。

总之,*Sox* 蛋白通过和特异性伴侣因子协同作用来操纵靶基因。基因组范围内,染色质免疫沉淀反应分析显示在鼠和人 ES 细胞内,*Oct3/4*、*Sox2* 和 *Nanog* 共享许多靶基因<sup>[11]</sup>。令人惊讶的是,剔除掉 *Sox2* 的鼠 ES 细胞可以通过导入 *Sox2* 或 *Oct3/4* 的 cDNA 来挽救,因此说明,*Sox2* 最初的功能也许是维持 *Oct3/4* 的表达,*Oct3/4* 靶基因的表达如 *Fgf4* 和

*UTF1*,可能是通过其他 *Sox* 家族蛋白来维持。

### 2.4 c-Myc

*c-Myc* 最初是作为一个原致癌基因发现的,活跃于很多人类肿瘤中,但它也是一种转录因子,是正常细胞生长和增殖所必需的。*c-Myc* 基因既是一种可易位基因,又是一种多种物质调节的可调节基因,也是一种可使细胞无限增殖,获永生生化功能,促进细胞分裂的基因。*Myc* 基因参与细胞凋亡,与多种肿瘤发生发展有关。*c-Myc* 基因主要通过扩增和染色体易位重排的方式激活,与某些组织肿瘤的发生、发展和演变转归有重要关系。*c-Myc* 过量表达与肿瘤的早期复发有关。它影响基因表达的能力过去曾被认为是其促进肿瘤发育的手段,但关于 *c-Myc* 也影响 DNA 复制的发现直接表明,对于它的某些作用应有另一种解释。通过定位 DNA 合成点及与复制前复合体相结合,*c-Myc* 能够控制 DNA 复制:当失控时,同一机制也许还能引起 DNA 损伤和不正确的细胞增殖。剔除 *c-Myc* 基因的鼠胚胎重合子,在妊娠期 9.5~10.5 d 之间会死亡<sup>[21]</sup>。死亡胚胎的病变畸形包括心脏、心包膜和神经管的畸形,同时也包括胚胎发育滞后或停滞。在人体基因组内有 25 000 多个 *Myc* 结合位点。通过绑定基因组内 *c-Myc* 的结合位点,*c-Myc* 可以修改染色质的结构和调节非编码 RNAs 的表达。

### 2.5 KLF4

*KLF4* 属于 *Krüppel*-类因子(*KLFs*),转录因子 *KLF4* 通过调节其下游目标基因的表达而影响细胞整体的生理功能。*KLF4* 在皮肤和胃肠道上皮细胞的有丝分裂后期高度表达。*KLF4* 在 *MEF* 和 *NIH3T3* 细胞等成纤维细胞中也表达。最初研究发现,一些与细胞生长抑制有关的条件,如血清饥饿、接触抑制、DNA 损伤,能使 *KLF4* 的表达上调,外源性 *KLF4* 表达可抑制 DNA 合成及细胞的生长<sup>[22]</sup>,其机制来自检测 *KLF4* 表达对 DNA 损伤诱导的生长抑制反应的研究。Chne 等<sup>[23]</sup>研究结果进一步表明 *KLF4* 通过调节一些细胞周期调控及分化有关基因的表达而在细胞的增生、分化及细胞周期调控中担负着重要角色。*KLF4* 基因对于 ES 细胞的自我更新和未分化状态的维持不是必需的,但是如果全部剔除掉 *Krüppel*-类家族的基因,将会使 ES 细胞分化和中断 ES 细胞的自我更新。*KLFs* 和 *Nanog* 基因的位点绑

定在一起, *Nanog* 和其他基因是 *KLFs* 蛋白生物学功能发挥的效应器, *KLFs* 基因是 ES 细胞鉴定的重要媒介物<sup>[24]</sup>。Shields 等<sup>[22]</sup>发现, 在 *NIH3T3* 生长停滞期的细胞内, *KLF4* mRNA 表达水平很高, 但在指数生长期的细胞内却检测不到。*KLF4* 既是肿瘤抑制基因又是致癌基因, 在细胞培养过程中, *KLF4* 的过度表达会导致 DNA 的合成和细胞周期的正常进行受到抑制。缺乏 *KLF4* 基因的胚胎发育正常, 但新生鼠会在出生后 15 h 内死亡, 并显示削弱了皮肤和大肠的分化, 表明 *KLF4* 在对细胞的扩增和分化承担了重要的开关作用<sup>[25]</sup>。

## 2.6 LIN28

*LIN28* 属于小分子 RNA, 是一类 20~25 个碱基可调控其他基因表达的小分子非编码 RNA, 它广泛存在于各种真核生物中。*LIN28* 对重新编程细胞克隆的恢复有持续的适当的调节作用。虽然 *LIN28* 能影响细胞重新编程的效率, 但实验结果证明 *LIN28* 对细胞初期的重新编程不一定是必需的, 对随后的重新编程细胞的稳定增殖也不一定是必需的<sup>[5]</sup>。

## 3 几种转录因子的协同作用

Yamanaka 研究小组<sup>[2]</sup>认为来自体细胞的 iPS 细胞需要通过两种与肿瘤相关的基因产物 *c-Myc* 和 *KLF4* 的协同作用来获得。*Myc* 蛋白能引起原代成纤维细胞中 p53 属的凋亡, *KLF4* 可以抑制 p53 的凋亡。同时 *KLF4* 可以激活 p21 来抑制细胞增殖。*c-Myc* 可削弱 *KLF4* 对 p21 的抑制作用。因此, *c-Myc* 和 *KLF4* 之间的平衡在 iPS 细胞的形成过程中起了关键作用。在细胞的诱导变化过程中 *c-Myc* 的功能没有被限制。多能干细胞有开放的和活跃的染色质结构。单方面地强制表达 *c-Myc* 和 *KLF4* 其中之一将会导致产生肿瘤细胞。*Oct3/4* 可以指导细胞向类 ES 细胞变化而远离肿瘤细胞。*c-Myc* 通过对染色质结构发挥作用使得 *Oct3/4* 激活或抑制对应的靶基因。然而, 对于诱导多能性仅有 *Oct3/4* 是不够的。还需要 *Sox2* 来协同激活大量的靶基因。*KLF4* 也作为 *Oct3/4* 和 *Sox2* 的辅助因子协同发挥作用。研究发现, 剔除 *Sox2* 的鼠 ES 细胞可以通过转入 *Oct3/4* 来补救<sup>[20]</sup>。细胞多能性可以通过 ES 细胞内处于较低水平的其他 *Sox* 蛋白来维持, 诱导多能性时需要更多的 *Sox*

蛋白参与。

## 4 iPS 细胞的应用前景

### 4.1 回避伦理争议

ES 细胞被誉为“万能细胞”, 但一直以来, 获取人体 ES 细胞必须摧毁胚胎, 这一点颇受非议。科学界一直希望找到一种方法, 能够不损坏胚胎提取干细胞或者找到 ES 细胞的替代品, 这次的实验就是一个有益的尝试。如果在人类身上也能取得成功, 就不必再为治疗目的损坏人类胚胎, 那么长期以来围绕这一问题的伦理争论和医学政策将不存在了。

### 4.2 为再生医学提供治疗用的种子细胞, 取代传统体细胞核移植

如果生产的人类 iPS 细胞能够真正成为 ES 细胞的替代品, 这样的手法可能导致重大医疗突破, 能够取代传统方法——体细胞核移植即治疗性克隆。即 iPS 细胞可发展成遗传特征与病人完全吻合的细胞、组织或器官, 以前器官移植治疗方法中经常出现的排异反应问题因此得到了彻底解决, 血细胞、脑细胞、骨骼和内脏等都将可以更换, 白血病、帕金森氏症、心脏病等顽疾也有望得到有效治疗。

## 5 iPS 细胞研究中存在的问题与对策

### 5.1 iPS 细胞的诱导效率极低

本研究的关键性问题是 iPS 细胞的诱导效率极低, 仅有不到 1%。一种可能是 iPS 细胞可能来源于与成纤维细胞混合存在的组织干细胞或祖细胞。一个发现印证了这种假设, 在胃肠道 *Oct3/4* 的异位表达阻碍了祖细胞的分化<sup>[26]</sup>; 另一种可能是, 除了这 4 种因子外, 另外还需要一种或几种因子通过逆转录病毒导入来激活。在维持多能性方面起关键作用的候选因子如染色质重塑因子 *ISWI* 和 *Brg1*, 他们可能也参与了卵母细胞核的重新编程。iPS 细胞的成功诱导与这四种因子特定表达量和模式的变化均有关系。

### 5.2 安全性问题

Yamanaka 在研究中揭示了基因改造对这种特殊老鼠的后代的“副作用”——在 121 只老鼠中, 有 20% 产生了肿瘤<sup>[1]</sup>。这说明使用逆转录病毒插入基因容易引发致癌基因的活性, 诱导组织产生肿瘤。进入细胞内染色体位点上的几个新基因, 有可能阻断

某些正常基因的功能;并且这几个基因有可能都是癌基因,存在诱发机体产生肿瘤的可能。替换掉几个可能与致癌作用有关的导入基因,如 *c-Myc* 基因,它是一种可易位、可调节、可使细胞无限增殖和获得永生生化功能的基因。在体内 *c-Myc* 基因的过度表达与某些组织肿瘤的发生、发展和演变转归有重要关系。如果替换掉 *c-Myc* 基因,产生肿瘤的可能性也许会小点。

### 5.3 诱导体细胞重新编程的机制

诱导体细胞重新编程的机制目前还不清楚,有学者认为细胞实现转变应该和去甲基化密切相关。我们从干细胞(甲基化程度较低)和非干细胞(甲基化程度很高)的区别可以推测甲基化的作用。试想如果可以让甲基化的基因全部恢复去甲基化状态会是一种什么情况?于是我们设想,在转入几种基因后,合成一种(或多种)酶或者蛋白,能够将甲基化的基因(失活)去甲基化,从而恢复多能或者全能的细胞状态,当然这只是一种猜测,还有待深入研究。

### 5.4 诱导分化的条件

从理论上说,iPS细胞的功能类似于通过胚胎克隆技术取得的ES细胞,能够最终培育成人体组织或器官。但iPS细胞的诱导分化是否和ES细胞的诱导条件相同还不得而知。目前Yamanaka只报道了iPS细胞诱导为心肌和神经细胞,还未见其他细胞的报道。

### 5.5 细胞替代治疗中的功能替代

即使能够获得患者特异的ES细胞,细胞替代治疗是否能实现功能再生,这还需要更多的动物实验来证实。现在所研究的iPS细胞与真正的ES细胞在很多方面差异很大,而这些试验产物的均一性以及他们是否有危害就更难说。配子和胚胎的发育经历的独特变化是无法人工模拟的,这期间使ES细胞具有维持自身全能性所需的结构和功能独特的基因组中也发生了很多复杂变化如甲基化和去甲基化等。而ES细胞的细胞质本身也有其独特性。所以仅仅靠转入4个相关基因得到的细胞能否有ES的特殊本领还有待研究。

总之,获取iPS细胞的研究为生产病人和疾病的特定多能干细胞开辟了一条新的途径。对于人iPS细胞是否能替代hES细胞在医疗上的应用还需进一步的研究。我们下一步的研究工作将是揭开体细胞

回调成ES细胞的基因或改变进程的机制,并找出一种方法,即此方法是通过开放一些基因来使细胞重新编程而不是靠插入新的基因副本来完成。在不远的将来我们只需加入一些小分子即可获得不发生遗传改变的重新编程细胞。

## REFERENCES

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **25**(126): 663–676.
- [2] Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotech*, 2007, **18**(5): 467–473.
- [3] Qin D, Li W, Zhang J, *et al.* Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by *Oct4/Sox2/Myc/Klf4*. *Cell Res*, 2007, **17**(11): 959–962.
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, **131**(5): 861–872.
- [5] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from Human somatic cells. *Science*, 2007, **318**(5858): 1917–1920.
- [6] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without *Myc* from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotech*, 2008, **26**(1): 101–106.
- [7] Park IH, Zhao R, West JA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, **451**(7175): 141–146.
- [8] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(15), 5856–5861.
- [9] Liao J, Wu Z, Wang Y, *et al.* Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res*, 2008, **18**(5): 600–603.
- [10] Palmieri SL, Peter W, Hess H, *et al.* *Oct-4* transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*, 1994, **166**(1): 259–267.
- [11] Loh YH, Wu Q, Chew JL, *et al.* The *Oct4* and *Nanog* transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Gen*, 2006, **38**(4): 431–440.
- [12] Chew JL, Loh YH, Zhang W, *et al.* Reciprocal transcriptional regulation of *Pou5f1* and *Sox2* via the *Oct4/Sox2* complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(14): 6031–6046.
- [13] 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, **113**(5): 631–642.

- [14] Morrissey EE, Tang Z, Sigrist K, *et al.* *GATA6* regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev*, 1998, **12**(22): 3579–3590.
- [15] Sun-Wada GH, Manabe S, Yoshimizu T, *et al.* Upstream regions directing hearts specific expression of the *GATA6* gene during mouse early development. *J Biochem (Tokyo)*, 2000, **127**(4): 703–709.
- [16] Chambers I, Colby D, Robertson M, *et al.* Functional expression cloning of *Nanog*, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 2003, **113**(5): 643–655.
- [17] Yung S, Gokhan S, Jurcsak J, *et al.* Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(25): 16273–16278.
- [18] Cavaleri F, Scholer HR. *Nanog*: A new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*, 2003, **113**(5): 551–552.
- [19] Suzuki A, Raya A, Kawakami Y, *et al.* *Nanog* binds to *Smad1* and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(27): 10294–10299.
- [20] Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, *et al.* Pluripotency governed by *Sox2* via regulation of *Oct3/4* expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell*, 2007, **9**(6): 625–635.
- [21] Davis AC, Wims M, Spotts GD, *et al.* A null *c-myc* mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev*, 1993, **7**(4): 671–682.
- [22] Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem*, 1996, **271**(33): 20009–20017.
- [23] Miller KA, Eklund EA, Peddinghaus ML, *et al.* Kruppel-like factor 4 regulates laminin alpha 3A expression in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**(46): 42863–42868.
- [24] Jiang J, Chan YS, Loh YH, *et al.* A core *Klf* circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(3): 353–360.
- [25] Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, *et al.* The zinc-finger transcription factor *Klf4* is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, 2002, **129**(11): 2619–2628.
- [26] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, *et al.* Ectopic expression of *Oct-4* blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*, 2005, **121**(3): 465–477.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

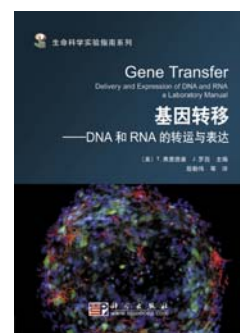
### 基因转移: DNA 和 RNA 的转运与表达 (译)

[美] T 弗里德曼 J 罗西主编 殷勤伟 等译

978-7-03-021337-2 ¥118.00 2008年8月25日出版

本书是一本目前最为全面而详尽地介绍各种基因转移技术的基础理论、必需的用品器材、具体的操作步骤及注意事项等方面的实验室手册。本手册从实用角度出发,着重阐述了70多项实验操作,内容包括各类病毒载体和非病毒载体的特点、构建、制备和应用以及调控基因表达的高新技术。手册既注重培养初学者的基本操作技能,又利于提高研究者分析和解决问题的能力。书中的实验可自行拆分,便于研究者根据实际需求灵活选择。

本书可供细胞生物学、分子生物学、功能基因组学、RNA组学、遗传学、基础与临床医学、生物技术、药学以及农、林、牧等方面的科研、教学、技术人员,以及研究生、临床医生和生物医药公司的研发者参考使用。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>