

文章编号: 1004-0374(2009)02-0299-04

转录因子与诱导型多能干细胞

张琦^{1,2}, 刘思国², 陈建泉², 成国祥^{1,2,*}

(1 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200300; 2 上海转基因研究中心, 上海 201210)

摘要: 小鼠的成纤维细胞通过转染四种转录因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4)可以被诱导转变成类似胚胎干细胞的多能性干细胞,称之为诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS),这种多能干细胞在细胞形态、增殖速率、致瘤性、基因表达以及形成嵌合小鼠的能力上与胚胎干细胞有许多相似之处,将来可能成为胚胎干细胞在临床应用中的替代。本文综述了 iPS 相关的几种转录因子,及其在重编程过程中的作用以及 iPS 的发展前景。

关键词: 转录因子; 诱导型多能干细胞; 重编程

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Transcription factor and induced pluripotent stem cells

Zhang Qi^{1,2}, Liu Si-guo², Chen Jian-quan², Cheng Guo-xiang^{1,2,*}

(1 School of Life Science and Medical Engineering, Tongji University, Shanghai 200300, China; 2 Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201210, China)

Abstract: Pluripotent stem cells can be generated from mouse fibroblasts by the introduction of four transcription factors (Oct3/4, Sox2, c-Myc and Klf4), which called induced pluripotent stem cells (iPS). iPS cells share many properties with embryonic stem cells (ESC) in morphology, proliferation, teratoma formation, gene expression and competency for adult chimera, and may be used as a substitute for the clinical application of ESC. In this review, we will summarize the crucial roles of transcription factors in nuclear reprogramming and developments of iPS cells.

Key words: transcription factor; induced pluripotent stem cell; reprogramming

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESC)是一种源自早期胚胎的多能性细胞。传统获得多能性细胞的方法主要是通过体外分离培养。近来,建立了通过核移植和细胞融合的方法^[1],但它们存在着伦理、卵母细胞来源有限和临床治疗引起免疫排斥等问题。因此,大大限制干细胞的实际应用,同时也促使科学家努力寻找其他可替代的方法。通过转录因子诱导成体细胞去分化为诱导型多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)成功,这种体外获得多能细胞的方法,不但有效的避免伦理和卵母细胞来源的问题,同时也使得自体移植治疗指日可待,为干细胞的应用提供了更广阔的空间^[2]。

1 iPS相关的转录因子

Yamanaka^[1]从与干细胞多能性维持相关的24个

候选因子中筛选出诱导成体细胞重编程为多能性细胞所需的四种转录因子: Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4。

1.1 Oct4 Oct4 是 Oct 家族的一员,在干细胞、早期胚胎和生殖细胞中特异表达^[3],在胚胎发育的囊胚期、胚胎内细胞团(ICM)、外胚层、卵细胞和卵裂球中限制表达。在一些多能性细胞,如 ESC、畸胎瘤干细胞、胚胎生殖细胞等也有表达,但是一旦细胞发生分化,Oct4 就不再表达。随着 Oct4 基因表达水平的不同,ESC 的命运也不同:Oct4 的

收稿日期: 2008-12-01; 修回日期: 2009-01-04

基金项目: “863”计划(2006AA02A102); 上海市科技攻关项目(06dj14001)

*通讯作者: chenggx@cngene.com

表达上调两倍导致细胞分化为胚外内胚层和中胚层; Oct4 基因表达水平下调可使ES 细胞分化为滋养外胚层细胞, 细胞失去多能性, 但分化为滋养层细胞利于胚泡进行子宫内膜植入。因此, Oct4 在维持干细胞多能性和干细胞的分化命运中起到重要作用^[4-7]。

1.2 Sox2 Sox2 是一种与 SRY 蛋白相关的含 HMG box 的转录因子, 识别基序为 A/TA/TCAAA/TG。与 Oct4 一样, Sox2 对早期胚胎的发育至关重要, 常被作为一种多能性细胞谱系的分子标记, 在 ICM、外胚层和生殖细胞中表达; 与 Oct4 不同的是, Sox2 不仅在胚外外胚层表达, 而且在中枢神经发育系统的一些未分化的干细胞或前体细胞中也有表达, 并可起到标示作用。敲除 Sox2 基因的小鼠胚胎在着床期因卵圆柱结构缺失而死亡, 而且这种囊胚无法在体外获得非分化的细胞, 只产生滋养外胚层和原始内胚层样细胞。体外试验表明, 敲除 Sox2 基因可导致 ES 细胞分化为滋养外胚层。可见, Sox2 对于干细胞多能性状态的维持是不可或缺的^[8,9]。

1.3 c-Myc c-Myc 是早期发现的癌基因之一, 与多种肿瘤发生、发展相关, 是 Myc 基因家族的重要成员之一^[10]。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, 获永生化功能的基因。c-Myc 基因的表达一般与细胞的生长状态有关, 如用生长因子刺激成纤维细胞, 可导致 c-Myc 表达增强, 相反, 在细胞分化时 c-Myc 表达降低。在细胞培养过程中, 用 c-Myc 表达结构或反义寡脱氧核酸进行研究, 发现 c-Myc 在细胞 G₀ 期到 S 期的过程中也起作用, 同样表明 c-Myc 表达的变化与细胞的增殖及分化状态有关, 其表达产物在调节细胞生长、分化或恶性转化中发挥作用。

1.4 Klf4 Klf4 是属于 Kruppel 样因子的锌指蛋白, 含有与果蝇胚胎模式调控因子 Kruppel 类似的氨基酸序列。在细胞培养过程中, 抑制 Klf4 的表达可导致 DNA 合成和细胞周期受抑。Klf4 基因敲

除的小鼠发育异常, 出生 15d 内死亡, 且在皮肤细胞表现不对称分裂。因此, Klf4 在从细胞增殖到细胞分化的转变中起到很重要的作用。最近 Klf4 的双重作用分子机制逐步被阐明。研究人员发现, 当 Klf4 异位表达抑制细胞增殖时, 只要去除其靶基因 p21, 此抑制细胞生长的效果即可得到补偿。在 p21 缺失得细胞中, Klf4 可以通过下调 p53 来促进细胞增殖。因此, p21 可能是决定 Klf4 信号效能的重要因素。在小鼠 ESC 中, 当 STAT3 失活会引起 Klf4 表达下降; 若 Klf4 过量表达, 则会引起 LIF 非依赖性的自我更新, 同时 Klf4 在 ESC 自我更新过程中所起到的积极作用也得到了证实^[11,12]。

1.5 其他转录因子 在目前可诱导成体细胞重编程的转录因子组合当中 Oct4 和 Sox2 是必不可少的, 再次证实两者对于调控和维持细胞多能性的重要作用, 但是同样处于干细胞复杂的调控网络核心位置的 Nanog 却并不是成体细胞重编程必要因子, 只有在和 Lin28 组合下, 与 Oct4、Sox2 共同完成诱导过程。在干细胞调控网络中, 其他转录因子, 如 STAT3、ZIC3、Rex1 和 Foxd3 等及 Oct4、Sox2 和 Nanog 的靶基因同样发挥着重要作用(表 1)。因此, 只有完全阐明调控网络的每一个环节, 确定每个因子的作用, 我们或许发现更多的转录因子可以替代现有组合而取得更好的效果。

2 转录因子与细胞重编程

在 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四个因子的作用下, 成体分化细胞可以逆转细胞分化程序, 重编程为具有干细胞能性的多能细胞, 且在生物学功能上几乎与 ESC 没有分别, 并成功地应用到疾病模型的治疗上, 到底是怎样的机制使得细胞得以逆转, 具体的程序我们现在仍然不是很清楚, 但是据现有的证据, 我们可以得到如下推测。

干细胞在许多生物学特性上与肿瘤细胞十分相似, 当干细胞植入免疫缺陷的老鼠中便可以形成肿瘤, 因此, 两个肿瘤相关因子 c-Myc 和 Klf4 诱导体细胞向多能细胞逆转的过程也就不足为奇了。在

表1 几组可用于重编程转录因子组合

| 种属 | 细胞类型 | 转录因子组合 | 药物筛选 |
|------|-------|---|-----------------------------|
| 鼠, 人 | 成纤维细胞 | Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc ^[2, 28] | Fbx15-neo、Nanog- 或 Oct4-neo |
| 鼠 | 成纤维细胞 | Oct4、Sox2、Klf4 和 n-Myc ^[21] | None |
| 人 | 成纤维细胞 | Oct4、Sox2、Nanog 和 LIN28 ^[22] | None |
| 人 | 成纤维细胞 | Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog 和 LIN28 ^[24] | None |
| 人 | 成纤维细胞 | Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、hTert 和 SV40 large T ^[25] | None |

成纤维细胞中, Myc 蛋白可以引起依赖 p53 蛋白信号通路的细胞凋亡; K1F4 则可能抑制 p53 和 c-Myc 引起的凋亡。另一方面, K1F4 激活 p21 并抑制细胞增殖; 而 c-Myc 则可以通过抑制 p21 来消除 K1F4 的这种抑制细胞生长的作用^[12]。因此, 在 c-Myc 和 K1F4 之间的平衡有可能在 iPS 产生过程起到重要的作用, 但仅仅表达 c-Myc 和 K1F4 只会引起肿瘤细胞的形成而不是多能性细胞, 是干细胞特异表达因子 Oct4 和 Sox2 指导细胞命运从肿瘤细胞转向 ES 样细胞。Oct4、Sox2 和 Nanog 位于干细胞自我更新和自身多能性的维持网络调控的中心环节, 它们组成一个转录调控复合体, 通过前馈系统和自身调节网络来实现对大量靶基因及其自身编码基因的转录调控。该复合体可调控的靶基因包括: FGF4、UTF1、Fbx15 以及自身的 Oct4、Sox2 和 Nanog 等基因, 还可以与其他因子共同作用, 如与 K1F4 协同来调控 Lefty1 启动子的活性。基因组水平的免疫共沉淀分析得出在人和小鼠 ESC 表达的基因中, 大部分都是由 Oct4、Sox2 共同作用调节的^[13-15]。

因此, c-Myc 和 K1F4 促进成体细胞向多能细胞转变, 而 c-Myc 蛋白通过改变染色体结构而使 Oct4 和 Sox2 共同作用可以适时的激活或抑制某些靶基因, 通过调节干细胞的基因转录, 来控制胚胎 ES 细胞多潜能性及其细胞命运^[16-20]。因此, 转录因子既是 iPS 形成的启动因素, 也是 iPS 多能性维持的必需因素。

3 现状与展望

iPS 细胞的产生不仅可以有效的避免伦理之争, 更有可能取代近来建立的核移植胚胎干细胞 (ntES) 技术。值得注意的是, iPS 细胞不仅拥有几乎所有 ESC 的特性, 而且它完全通过体外程序产生, 无需体内过程, 所以具有更高的可控性、均质性和安全性, 解决了此前围绕干细胞研究的诸多道德和法律问题; 另外, iPS 细胞可方便地直接取材于患者的体细胞, 所获得的患者特异性 iPS 细胞模型可大大提高药物发现效率, 并提供了用于毒性检测的工具; 最后, 利用 iPS 细胞形成与患者具有完全免疫相容性的细胞、组织或器官, 可能会使得基于患者个性化的药物筛选和治疗策略成为现实, 其社会效益和经济前景不可限量。

正因为 iPS 细胞的应用前景不可限量, 在其产生后一年多时间里, Cell、Science 和 Nature 三家国际顶级科学杂志先后发表了数篇关于 iPS 的学术论

文, iPS 研究飞速发展。Robert Blelloch、Keisuke Okita 和 Marius Wernig 的进一步研究表明, 条件优化后诱导产生的集落不仅具有与正常 ES 细胞相似的多能性标记, 还能够产生嵌合体。同时, 在无抗性标记筛选的前提下, 一样可以获得多能性细胞^[21]。人的 iPS 不仅通过转染原有 Oct3/4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四转录因子获得成功, 在因子组合 Oct3/4、Sox2、Nanog 和 LIN28 的作用下, 同样可以获得 iPS 细胞^[22]; 诱导产生 iPS 的细胞类型由原来的成纤维细胞扩展到消化道细胞和肝细胞^[23]; 在 6 种因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、K1F4、Nanog 和 LIN28) 共同作用或者利用 SV40 的大 T 抗原可以有效提高 iPS 细胞的产生效率^[24, 25]; 另 iPS 细胞亦成功应用于治疗镰刀型细胞贫血症小鼠模型^[26]。

然而, 目前 iPS 的研究仍处于起步阶段, 存在许多问题和困难, 如诱导 iPS 细胞的产生效率低; 病毒介导的转基因需整合入宿主细胞的基因组; 干细胞相关转录因子在 iPS 细胞的分化后代中可被重新激活, 引发诸多异常等。这些无疑将严重阻碍 iPS 细胞的实际应用。因此, 如何有效地提高病毒转染的效率和安全性是我们急需解决的问题。Wernig 等^[27]实验证实: iPS 形成过程中, 诱导因子只提供了一种启动因素, 而干细胞的多能性和自我更新是通过基因启动后的自我调控网络维持的, 并不需要外源诱导因子的持续组成性表达。所以我们设想可以用可控性、安全性更强的穿透性蛋白的方法来替代病毒载体, 而且可以尝试多种的转录因子组合方式来提高 iPS 细胞效率, 以便我们更深入地了解 iPS 细胞形成的机理, 推动干细胞更为广泛的应用。

[参 考 文 献]

- [1] Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 39-49
- [2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76
- [3] Pan GJ, Chang ZY, Schöler HR, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*, 2002, 12(5-6): 321-9
- [4] Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, et al. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ*, 1999, 41(6): 675-84
- [5] Gerrard L, Zhao D, Clark AJ, et al. Stably transfected human embryonic stem cell clones express Oct4-specific green fluorescent protein and maintain self-renewal and

- pluripotency. *Stem Cells*, 2005, 23(1): 124-33
- [6] Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, et al. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, 2002, 16(10): 1209-19
- [7] Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, et al. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(3): 173-81
- [8] 陈艳玫, 姚 鑫. 转录因子 Sox2 的研究进展. *生命科学*, 2004, 16(3): 129-34
- [9] Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M, et al. Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 24371-9
- [10] Adhikary S, and Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(8): 635-45
- [11] Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem*, 1996, 271(33): 20009-17
- [12] Rowland BD, Peeper DS. KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(1): 11-23
- [13] Yuan H, Corbi N, Basilico C, et al. Developmental specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*, 1995, 9(21): 2635-45
- [14] Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 2003, 17(1): 126-40
- [15] Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, et al. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(20): 7772-82
- [16] Loh YH, Wu Q, Chew JL, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 2006, 38(4): 431-40
- [17] Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev*, 2006, 16(5): 455-62
- [18] 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 Biol*, 2007, 9(6): 625-35
- [19] 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): 6031-46
- [20] Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of nanog by Oct4 and Sox2. *J Biol Chem*, 2005, 280(26): 24731-7
- [21] Blelloch R, Venere M, Yen J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 245-7
- [22] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [23] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 2008, 321(5889): 699-702
- [24] 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): 600-3
- [25] Mali P, Ye Z, Hommond HH, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells*, 2008, 26(8): 1998-2005
- [26] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920-3
- [27] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007, 448(7151): 318-24
- [28] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72