

文章编号: 1004-0374(2009)03-0353-04

细胞重编程的分子机制

陈涛涛¹, 康九红^{2*}

(1 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

2 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

摘要: 细胞重编程, 尤其是诱导多能性干细胞的出现, 给再生医学带来极大的希望。近年来, 这方面的研究吸引了众多科学家的参与, 也取得了非常丰富的成果。本文主要从转录因子、表观遗传和信号转导等角度, 介绍了细胞重编程分子机制研究方面的进展和未来的方向。

关键词: 细胞重编程; 诱导多能性干细胞; 转录因子; 表观遗传; 信号转导

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Molecular mechanisms of cell reprogramming

CHEN Tao-tao¹, KANG Jiu-hong^{2*}

(1 Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2 School of Life Science and Technology, Tongji

University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Cell reprogramming, especially the generation of induced pluripotent stem cells (iPSC) has opened a new horizon in the treatment of degenerative illnesses. Studies on the generation and mechanisms of iPSC have been the hot-spot and breathtaking progresses, which have been made since the first report on the iPSC generation. In the present paper we review the role and molecular mechanism of transcription factors, epigenetic regulation and cell signaling in cell reprogramming.

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

胚胎干细胞(ESC)是一群来源于胚胎囊胚期内细胞团, 能够在体外无限增殖, 同时保持多向分化能力的细胞。十多年前, 人胚胎干细胞的成功分离给再生医学带来极大希望。科学家们预期ESC定向分化的研究将有助于加速细胞移植临床治疗的步伐。然而, ESC本身无法避免的伦理问题以及异体细胞移植的免疫排斥问题构成了ESC治疗应用于临床的巨大障碍。诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)的出现在很大程度上同时解决了以上两个问题, iPSC最初通过向体细胞中以病毒方式导入外源的四个转录因子而获得, 具有与ESC相似的形态和表观遗传特征, 更重要的是, 两者具有相似的分化能力, 即分化的全能性(pluripotency)^[1]。iPSC的出现使得无伦理争议的患者特异性(patient-specific)的干细胞获得成为可能, 而由患者特异性的iPSC分化得到的特异性前体细胞和成熟细胞在组

织器官移植治疗、基因治疗、药物筛选模型建立, 以及特异疾病分子机制的研究方面无疑具有相当大的优势和潜力^[2]。自2006年第一篇iPSC的报道以来, 这个领域已经在各国科学家的努力下有了突飞猛进的发展。目前, 已有三个小组宣布成功获得无病毒整合(virus free)的人类iPSC^[3-5]。但是, 在iPSC诱导技术迅速进展的同时, 对于iPSC诱导过程中分子机制的研究却进展缓慢, 这成为iPSC应用于临床的主要障碍。我们知道, 外源因子诱导的细胞重编程是一个非常缓慢的过程, 通常需要两周甚至更长时间, 在这个过程中, 大部分细胞并未被重编程, 只有极少数(一般为0.5%)的细胞在经过了若干个中间态之后被完全重编程^[6]。显然, 阐明这一过程的

收稿日期: 2009-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(30625014; 90919028)

*通讯作者 E-mail: jhkang@tongji.edu.cn

机制不仅有助于我们认识全能性的建立、细胞身份 (cellular identity) 的确立等一些基础的细胞生物学过程, 而且有助于发展更加安全和有效的 iPSC 诱导方法以及 iPSC 未来在临床方面的应用。反之, 在了解清楚 iPSC 形成的机制以及它可能对机体造成的影响之前, iPSC 很难走入临床一线治疗。

在外源因子诱导体细胞重编程形成 iPSC 的过程中, 细胞内的基因表达发生了革命性的变化, 即原来终末分化成体细胞特有的标志性基因被沉默的同时, 维持干细胞全能性必需的基因被激活了^[7]。由于这一过程中整个基因组没有变化, 显示细胞的重编程过程很大程度受到表观遗传学调节的控制, 但其中的分子机制以及各种表观遗传的变化又受到哪些因素调节目前报道还很少。本篇综述的目的在于探讨重编程分子机制研究的最新进展和将来可能的发展方向。

1 重编程过程的中间态

最初的 iPSC 是通过用药物筛选内源性基因 (包括 Fbx15, Oct3/4 及 Nanog) 的激活来获得的。有意思的是, 与通过 Oct3/4 或 Nanog 筛选获得的 iPSC 相比, 通过 Fbx15 筛选获得的 iPSC 与 ESC 之间有更大的差异, 表现为 Fbx15 筛选获得的 iPSC 囊胚注射不能获得嵌合体小鼠^[8-10]。因此, 通过 Fbx15 筛选获得的 iPSC 可能代表了一种不完全重编程的状态, 是重编程过程中的一种中间态。这一点也被后来的一系列研究证实, 即由外源因子诱导的重编程过程是一个缓慢的过程, 并包含若干个中间态。Konrad Hochedlinger 小组分析了小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 重编程为 iPSC 的动态过程, 发现这一过程中的一系列分子生物学事件是顺次发生的, 首先是 MEF 特异的 Marker 基因 Thy1 的下调, 紧接着是干细胞特异的 Alkaline phosphatase 和 SSEA-1 的激活, 接下来外源基因沉默, 内源的干性相关基因激活, 而端粒酶的激活和 X 染色体的重激活则是更晚发生的事件^[11]。Jaenisch 小组选取了完全重编程的 iPSC 细胞系和若干个处于不同状态的不完全重编程的细胞进行对比, 发现不完全重编程的细胞有些是因为干性相关基因启动子区的 DNA 甲基化状态未能成功改变, 有些是因为这些细胞仍表达一些成体细胞特异的转录因子。相应的, 如果用 DNA 甲基化酶抑制剂 AZA 处理细胞去除 DNA 甲基化, 或敲除相应的组织特异性转录因子, 就可以使这些不完全重编程的细胞到达完全重编程的状态^[12]。这些研究也从

另外的侧面证明了一种细胞发育和分化的模型, 即细胞的身份是由转录因子决定, 并由细胞的表观遗传状态来保持。

重编程中间态的出现可能与外源导入的转录因子在基因组上的结合情况有关。Sridharan 等^[13]分析了 Yamanaka 因子 (Oct3/4、Sox2、cMyc 和 Klf4) 在完全重编程的 iPSC 及部分重编程的 iPSC 中的基因组结合位点, 并与 ES 细胞中的相应数据进行比较。他们发现, 在部分重编程的细胞中, 任意一个 Yamanaka 因子单独结合的基因已经到达了与 ES 细胞相似的状态, 但是在 ES 细胞中被 Oct4、Sox2 和 Klf4 共同结合的一些重要的干性相关因子在部分重编程的细胞中则没有被这些因子结合, 因而也没有完全被激活。同时, 如果分别将四个因子单独导入到 MEF 中, cMyc 可以导致最类似于 ES 细胞的表达谱, 这说明 cMyc 发挥作用主要在重要的干性相关因子激活之前, 而其他因子起作用的时间更靠后, 但对于完全的重编程则更关键^[13]。对重编程中间态机制进行深入研究, 有助于从一个全新的角度去诠释细胞分化和发育中的关键问题。

2 转录因子在 iPSC 诱导中的功能

2006 年, 由 Yamanaka 领导的研究小组发表了第一篇 iPSC 的研究论文, 报道了将 Yamanaka 因子同时导入 MEF 中即可诱导细胞获得分化的多能性。紧接着, 又有数个研究小组重复了这一实验结果, 并证明 cMyc 基因对于完全的重编程并不是必需的^[8-10, 14]。这些开创性的工作使得以 Yamanaka 因子为代表的转录因子成为了 iPSC 研究者们关注的焦点。很快, 科学家们就发现, Yamanaka 因子并不能把所有种类的细胞都转变为 iPSC, Jaenisch 小组的研究发现成熟的 B 细胞重编程为 iPSC 需要在四因子的基础上过表达骨髓细胞特异的转录因子 C/EBP α , 或者抑制 B 细胞特异的转录因子 Pax5, 说明虽然不同种类的细胞可能都具有通过重编程形成 iPSC 的潜力, 但是细胞的类型和分化状态对于重编程有重要的影响^[15]。此后, Yu 等^[16]发现利用 Oct3/4、Sox2、Nanog 及 Lin28 的组合也可以成功地获得人的 iPSC; Mali 等^[17]发现在 Yamanaka 因子或 Oct3/4、Sox2、Nanog 及 Lin28 组合基础上添加 SV40 T antigen 都能大大提高重编程的效率; Liao 等^[18]发现 Oct3/4、Sox2、cMyc、Klf4、Nanog 及 Lin28 六因子的组合能使重编程的效率提高 10 倍; Yang 等^[19]发现在四因子基础上增加 UTF1 同时抑制 p53 基因的

表达可以提高重编程的效率; Feng等^[20]报道了核受体 *Essrrb* 在重编程过程中可以替代 *cMyc* 和 *Klf4* 的作用。更让人鼓舞的是, Hans Scholer 小组于2008年报道, 由于神经干细胞(NSC)内源高表达 *Sox2* 基因, 所以仅用两因子(*Oct3/4*、*cMyc* 或 *Oct3/4*、*Klf4*)就可以成功地把NSC重编程为 *iPSC*^[21]。随后, 他们又成功地仅用 *Oct3/4* 一个因子就将NSC诱导成为 *iPSC*^[22]。NSC 细胞可由四因子、三因子、两因子直至一因子的不同组合达到完全重编程的目的, 不仅为研究不同转录因子在重编程过程中的作用提供了极好的模型, 为研究不同种类细胞重编程和 ESC 细胞定向分化中转录因子的功能提供了示范, 也为科学家们最终不依靠外源基因转入诱导 *iPSC* 的目标提供了基础和信心。

3 表观遗传调节在 *iPSC* 诱导中的功能

在 *iPSC* 的诱导过程中, 起始细胞的基因组并没有改变, 但基因表达及基因启动子区 DNA 甲基化、组蛋白修饰等则发生了重要变化^[6-8, 10-12], 重编程领域的众多科学家认定 *iPSC* 形成过程实质上就是一个全基因组范围内的表观遗传修饰的重置过程。运用小分子化合物干预细胞表观遗传状态影响重编程效率和进程的研究进一步证实了这一观点。Jaenisch 小组发现在重编程过程中用 AZA 抑制 DNA 甲基化酶 *Dnmt1* 的活性可以提高重编程的效率, 证明基因组 DNA 的去甲基化是重编程过程中需要克服的一重障碍^[12]。Melton 小组发现组蛋白去乙酰化酶(Hdac)抑制剂 VPA 可以将四因子诱导的重编程效率提高一百倍之多, 说明组蛋白的去乙酰化也是细胞在重编程过程中需要克服的一道障碍^[23]。Ding Sheng 小组发现组蛋白 H3K9 甲基化酶的抑制剂 BIX 可以极大的提高重编程的效率^[24], 说明特定位点的组蛋白修饰(如 BIX 所针对的 H3K9me2)对重编程的进程有着重要的影响。尽管有各种表观遗传修饰调节 *iPSC* 形成的证据, 但不同表观遗传修饰在这一过程中的作用及机制在很大程度上仍是未知的, 这将是未来 *iPSC* 机制研究中最重要的一個方向。

4 基因转录调节网络和信号转导网络在 *iPSC* 诱导中的功能

Kim 和我们实验室分别研究了 ESC 细胞中外源和内源 Yamanaka 因子在全基因组范围内的结合位点。研究发现, Yamanaka 因子可以以单个、两个、三个或四个因子一起的方式结合在特定基因的启动子区, 而且不同转录因子间的结合具有协同作用,

仅被一个因子(*cMyc* 外)结合的基因在 ESC 细胞中表现为沉默, 而被两个或两个以上因子结合的基因则多表现为激活; 同时, 被转录因子 *cMyc* 结合的基因, 无论表达还是生物学功能都明显的不同于被其他核心转录因子(*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*)结合的基因, 这在一定程度上解释了为什么 *cMyc* 基因对于完全的重编程并非是必需的^[25-26]。Chen 等^[27]也运用 ChIP-seq 的方法分析了干细胞相关转录因子(*Nanog*、*Oct4*、*STAT3*、*Smad1*、*Sox2*、*Zfx*、*c-Myc*、*n-Myc*、*Klf4*、*Esrrb*、*Tcfcp2l1*、*E2f1*、*CTCF*)与两个转录调控因子(*p300*、*Suz12*)间的关系, 扩展了干细胞相关转录因子调控网络的范围。这些研究为转录因子调控网络在重编程过程中的机制研究提供了丰富的信息。我们的研究还利用生物信息学手段, 从信号转导网络的角度进一步研究了 Yamanaka 因子在 ESC 细胞多能性维持和体细胞重编程中的作用, 发现 Yamanaka 因子共同调控了16条发育相关的信号通路, 其中9条通路在 ESC 中的作用尚未见报道^[25]。近来的研究显示, MEK pathway 的抑制剂 PD0325901、Wnt 信号通路的激活剂、L-型钙离子通道激活剂都能有效提高 *iPSC* 的重编程效率; 在特定信号通路抑制剂存在下, 终于克服了大鼠 ESC 细胞系建立这一科学界的难题等, 充分证明了信号转导通路研究在 ESC 全能性、分化以及 *iPSC* 重编程技术及机制研究中的关键作用^[28-30]。我们先前的研究也证明, 细胞信号转导是表观遗传修饰基因特异性的一个重要决定因素^[31]。考虑到信号转导通路小分子激动剂和抑制剂方面的丰富成果, 重编程信号转导机制的研究必将极大地推动 *iPSC* 小分子化合物诱导方案的建立和发展。

综上, 细胞重编程机制的研究仍处于起步阶段, 其中仍有许多未知的问题有待解决。特别是在已经获得了真正 virus free 的 *iPSC* 的情况下, 对于 ESC 和 *iPSC* 的比较可以完全排除外源基因残留的干扰, 这样我们就能更好的认识 *iPSC* 的本质及其与 ESC 的异同, 并把多年 ESC 研究的结果应用到 *iPSC* 的研究和应用中。同时, 阐明 *iPSC* 应用于临床可能带来的不良影响和副作用, 以便获得更适合于建立各种疾病模型和应用于临床的 *iPSC*, 也迫切要求对 *iPSC* 诱导机制进行更深入的研究。最后, 对于使用何种方法诱导 *iPSC*, 怎样才能更安全更有效, 也是细胞重编程机制研究的题中之意。为了尽可能获得完全重编程的细胞, 使用更少的因子或许并非

是最好的选择^[32],这就要求我们更充分的了解不同的转录因子、不同的表观遗传修饰以及不同的信号通路在细胞重编程过程中的作用。ChIP-chip 等高通量数据的获取和生物信息学手段的应用,无疑将极大地加速这些研究的进程。

[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] Daley GQ, Lensch MW, Jaenisch R, et al. Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 200-1
- [3] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, [Epub ahead of print]
- [4] Kaji K, Norrby K, Poca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458(7239): 771-5
- [5] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. Piggybac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458(7239): 766-70
- [6] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 151-9
- [7] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70
- [8] 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
- [9] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448(7151): 313-7
- [10] 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
- [11] Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPSC cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 230-40
- [12] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49-55
- [13] Sridharan R, Tchiew J, Mason MJ, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*, 2009, 136(2): 364-77
- [14] Wernig M, Meissner A, Cassady JP, et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 10-2
- [15] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133(2): 250-64
- [16] 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
- [17] 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
- [18] 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
- [19] Zhao Y, Yin XL, Qin H, et al. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 475-9
- [20] Feng B, Jiang J, Kraus P, et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(2): 197-203
- [21] Kim JB, Zaehres H, Wu GM, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454(7204): 646-50
- [22] Kim JB, Sebastiano V, Wu GM, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136(3): 411-9
- [23] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 795-7
- [24] Shi Y, Do JT, Desponts C, et al. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(6): 525-8
- [25] Liu XS, Huang JY, Chen TT, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Res*, 2008, 18(12): 1177-89
- [26] Kim JL, Chu JL, Shen XH, et al. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, 2008, 132(6): 1049-61
- [27] Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 2008, 133(6): 1106-17
- [28] Shi Y, Desponts C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 568-74
- [29] Marson A, Foreman R, Chevalier B, et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(2): 132-5
- [30] Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, et al. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, 135(7): 1299-310
- [31] Kang JH, Shi YF, Xiang B, et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*, 2005, 123(5): 833-47
- [32] Yamanaka S. A fresh look at iPSC cells. *Cell*, 2009, 137(1): 13-7